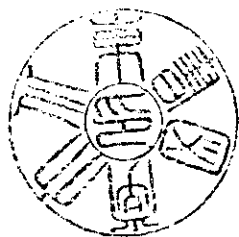


Marginal donor過小グラフトにおける肝グラフト機能向上の試み

| | |
|-----|---|
| 著者 | 里見 進 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/39737 |



Marginal donor 過小グラフトにおける肝グラフト機能向上の試み

17390343

平成17年度～平成18年度 科学研究費補助金
(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成19年5月

研究代表者 里見 進

東北大学・病院・教授

科学研究費研究成果報告書

【研究種目名】 基盤研究（B）

【研究期間】 平成 17 年度～18 年度

【課題番号】 17390343

【研究課題名】 Marginal Donor 過小グラフトにおける肝グラフト機能向上の
試み

【研究代表者】 里見 進（東北大学・病院・教授）

【研究分担者】 赤松 順寛（東北大学・病院・助手）
土井 秀之（東北大学・病院・助教授）
後藤 順一（東北大学・病院・教授）
宮城 重人（東北大学・病院・助手）

| | | |
|-----------------|------------|---|
| 【研究経費】 平成 17 年度 | 11,400,000 | 円 |
| 平成 18 年度 | 3,900,000 | 円 |
| 計 | 15,300,000 | 円 |

背景

近年、肝移植は末期肝疾患に対する治療法として確立され、社会的にも受け入れられている。わが国においては、1989 年以降、生体移植が毎年増加を続け、2003 年には 440 例に達し、累計でも 2600 余例に達している。また、1 年生存率、5 年生存率もそれぞれ 81.1%、76.7%と良好な成績が得られている¹。しかしながら、脳死ドナーは年間 10 名に満たない状況が続き、年間約 2200 例発生すると推定される肝移植適応患者のうち、生体肝移植が受けられない約 3/4 が、移植を受けられずに亡くなっていると考えられる。一方、適応拡大や手術成績の向上は、症例数の増加及び移植待機患者の増加をもたらし、米国においては 2005 年に生体、死体を合わせて 6000 例を超える肝移植が行われたが、同年新たに約 10000 人が waiting list に加わり、約 17000 人が移植を待っている状態である²。このような世界的なドナー不足を緩和するための選択肢の 1 つとして心停止ドナー（Non-heart-beating-donor: NHBD）からの移植が期待されている。

現在も海外ではいくつかの施設で NHBD からの移植が行われているが³⁻⁹、NHBD からの移植では HBD からに比べ、primary non-function（移植後早期機能不全）^{3,6,9}、胆汁鬱滞⁵、拒絶反応⁵、胆管狭窄⁸等の増加、また特に心停止前に臓器摘出に向けた管理を受けない uncontrolled NHBD からの移植では graft survival が低い等まだまだ課題も多い。

心停止肝グラフトでは、温阻血によってミトコンドリアでの酸化的リン酸化が阻害され ATP が枯渇し¹⁰⁻¹²、ATP、energy charge（ $(\text{ATP}+0.5\text{ADP}) / (\text{ATP}+\text{ADP}+\text{AMP})$ ）といった energy status が悪化することが以前より知られており¹²⁻²¹ 温阻血に伴う様々な臓器障害の引き金となる事が報告されている。即ち、ATP の減少に伴う ATPase 依存性ポンプの機能悪化は、肝細胞の膨化から⁴ 類洞の狭小化を引き起こし、微小循環障害の要因となる。それとともに細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇をもたらし Ca^{2+} -sensitive enzyme の活性化による細胞傷害が惹起される^{4,22}。また、温阻血下での ATP の分解から生じたキサンチンが再灌流時にキサンチンオキシダーゼによりフリーラジカルを産生し、再灌流障害を増悪させる^{4,11,21,22}。更に、肝臓に特有の事情として、その多彩な機能のほとんど全ては ATP の形での持続的なエネルギーの供給に依存しており¹⁵、energy status の悪化の影響は大きい。これらの事から、肝グラフトの energy status の改善は、グラフト機能向上はもとより肝細胞・組織障害の軽減効果も期待できる。

また、心停止肝グラフトに対する虚血再灌流障害は、グラフトの再酸素化に伴って引き起こされる一連の複合的機序によってもたらされる^{23,24} が、再灌流早期には、活性酸素種（reactive oxygen species : ROS）による酸化ストレスが肝障害に大きく関与している²⁵⁻²⁷。ROS は、再酸素化を受けたキサンチンオキシ

ダーゼ系や電子伝達系、そして冷保存再灌流によって活性化されたクッパー細胞から産生され²⁷、細胞膜上のリン脂質や蛋白質、核酸などに酸化的障害をもたらす^{28,29}。さらに、炎症反応における細胞内カスケードのメディエーターとして働き、貪食細胞活性化、類洞血管収縮、細胞接着分子発現を惹起させる^{30~33}。その結果、類洞内皮細胞の障害や血管収縮因子と血管拡張因子の不均衡が起こり、微小循環障害がもたらされると考えられている^{34,35}。従って、ROS を抑制する事により、心停止ドナー肝グラフトの機能改善が図れるのではないかと期待される。

目的

本研究では、心停止ドナーからの肝グラフトを想定し以下の A、B の 2 種類の実験を行い、心停止ドナーからの肝移植成績向上のための方法を開発することを目的とする。

A. 心停止ドナーからの肝グラフトに対する冷保存前灌流、及びビリベルジン添加の効果の検討

心停止肝グラフトに対し、グラフト摘出と冷保存の間に酸素化された buffer で一時的な灌流（冷保存前灌流）を行い、energy status とグラフト機能の改善が得られるかを検討するとともに、冷保存前灌流中にビリベルジンを添加し、その再灌流障害抑制効果を明らかにする。

B. 心停止ドナー肝グラフトに対するフリーラジカルスカベンジャー エダラボンの効果に関する実験的研究

温阻血冷保存を被った肝グラフトの再灌流障害におけるラジカルスカベンジャーであるエダラボンの効果を明らかにする。

研究結果の要約

平成 18 年度には以下に述べる結果を得た。

A. 心停止ドナーからの肝グラフトに対する冷保存前灌流、及びビリベルジン添加の効果の検討

【方法】雄性 Wister Rat を用いて、5 群に分け肝摘出再灌流実験を施行した。

a) コントロール群：心拍動下に全肝を摘出後、すぐに 1 時間の再灌流を施行。
b) 心拍動下グラフト (心拍動) 群：心拍動下に全肝を摘出。6 時間の冷保存後に 1 時間の再灌流を施行。c) 心停止下グラフト (心停止) 群：呼吸停止から死戦期を経て心停止を誘導し、心停止後 30 分の温阻血をおいて全肝を摘出。6 時間の冷保存後に 1 時間の再灌流を施行。d) 冷保存前灌流 (前灌流) 群：心停止群と同様に全肝を摘出後、すぐに 30 分の保存前灌流を施行。その後、6 時間の冷保存をおいて 1 時間の再灌流を施行。e) ビリベルジン(biliverdin : BV) 群：保存前灌流中に $10 \mu\text{mol}$ のビリベルジンを投与。

各群とも検体数は 5 とした。灌流は冷保存前灌流、冷保存後再灌流とも *ex vivo* 灌流装置を使用。酸素化された 37°C のクレブス-ヘンゼライト液を経門脈的に $10 \text{ cm H}_2\text{O}$ で灌流させた。冷保存には 4°C の University of Wisconsin (UW) solution を用いた。

検討項目は門脈灌流液量、胆汁産生量、エネルギーステータス、再灌流液中 AST 濃度、TNF- α 濃度、病理組織所見、肝組織中 malondialdehyde (MDA) である。

【結果】コントロール群、心拍動群と比べ、心停止群では灌流量、胆汁産生量が有意に減少していた。前灌流群では灌流量、胆汁産生量とも心停止群よりも有意に増加し肝微小循環及び機能の改善が見られた。BV 群では、灌流量は心停止群よりも有意に増加し前灌流群と同等であったが、胆汁産生量は心停止群と同等であった。冷保存前の energy charge、肝組織中 ATP 量は心停止群が HBD 群よりも有意に低下していたが、前灌流群では有意な回復が見られた。その効果は冷保存中も持続し、冷保存後の energy charge、肝組織中 ATP 量も心停止群と比べ前灌流群で有意に高値であった。また、再灌流後の energy charge、肝組織中 ATP 量は前灌流群で心停止群と比べ有意に高く、BV 群は前灌流群と比べ更に有意に高く、ATP 再産生能、即ちグラフト viability の改善が示唆された。再灌流液中の GOT は、コントロール群、心拍動群と比べ、心停止群、前灌流群、BV 群で有意に高かったが、BV 群では心停止群と比し有意に低値で細胞傷害の軽減が見られた。再灌流液中の TNF- α は、コントロール群、心拍動群と比べ、心停止群、前灌流群で有意に高く、BV 群では心停止群、前灌流群と比し、有意な低下が見られた。病理所見では、前灌流群、BV 群で、心停止群と比べ、類洞の狭小化、肝細胞の空胞変性が緩和されていた。また、BV 群では心停止群、前灌流

群と比べ肝細胞のアポトーシスが減少傾向にあった。肝組織中 MDA 量は、各群に有意差は見られなかったが、前灌流群、BV 群で低い傾向にあった。

【結論】冷保存前灌流によって心停止肝グラフトのエネルギーステータスの改善がもたらされ、それによってグラフトの **viability** 及び機能の改善が得られることが示唆された。また、冷保存前灌流中のビリベルジン添加により、更なるエネルギーステータスの改善と再灌流障害の軽減がもたらされる可能性が示唆された。

B. 心停止ドナー肝グラフトに対するフリーラジカルスカベンジャー エダラボンの効果に関する実験的研究

【方法】雄性 Wistar ラットを以下の 3 群に分け、ex vivo 摘出肝再灌流実験を施行した。1) 心拍動下グラフト群 (Heart-beating ; HB 群) : 心拍動下に肝摘出し、6 時間冷保存後再灌流。2) 心停止下グラフト群 (Non-heart-beating ; NHB 群) : 開胸により心停止を誘導し、30 分間の温阻血を置いた後、肝摘出、6 時間冷保存後再灌流。3) エダラボン投与群 (Edaravone ; ED 群) : 肝摘出、6 時間冷保存は NHB 群と同様に施行し、再灌流液中にエダラボンを 1mg/l の濃度で添加。3 群とも再灌流時間は 60 分間とし、その後にサンプルを採取した。検査項目は、門脈灌流液量、胆汁産生量、生化学検査、過酸化脂質濃度、TNF- α 、IL-1 β 、エネルギーチャージ、開存類洞腔面積である。

【結果】NHB 群に比して ED 群では脂質過酸化、炎症性サイトカイン産生が有意に抑制され、エネルギーチャージ値、胆汁産生量、門脈灌流液量に有意な改善を認めた。微小循環の指標として算出した開存類洞腔面積は、有意な差を認めないまでも、NHB 群に比し ED 群で改善傾向にあった。

【結語】活性酸素種は温阻血冷保存によってもたらされる虚血再灌流障害において重要な役割を担っており、エダラボンによる活性酸素種の抑制が心停止ドナーからの肝移植におけるグラフト機能改善に有効であると考えられた。

参考文献

1. 日本肝移植研究会: 肝移植症例登録報告 日本移植学会誌「移植」39: 634-642, 2004
2. National Data of the Organ Procurement and Transplantation Network, Available at <http://www.optn.org/latestData/rptData.asp>, Accessed June 13, 2006
3. Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, et al: Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. Transplantation 59: 197-203, 1995
4. Reddy S, Zilveti M, Brockmann J, et al: Liver transplantation from

non-heart-beating donors: Current status and future prospects. *Liver Transpl* 10: 1223-1232, 2004

5. Reich DJ, Munoz SJ, Rothstein KD, et al: Controlled non-heart-beating donor liver transplantation. A successful single center experience, with topic update. *Transplantation* 70: 1159-1168, 2000

6. D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, et al: Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors. *Surgery* 128: 579-588, 2000

7. Fukumori T, Kato T, Levi D, et al: Use of older controlled non-heart-beating donors for liver transplantation. *Transplantation* 75: 1171-1174, 2003

8. Abt P, Crawford M, Desai N, et al: Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors: An increased incidence of biliary complications. *Transplantation* 75: 1659-1663, 2003

9. Otero A, Gomez-Gutierrez M, Suarez F, et al: Liver transplantation from Maastricht category 2 non-heart-beating donors. *Transplantation* 76: 1068-1073, 2003

10. Peralta C, Hotter G, Closa D, et al: Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in rat: Role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 25: 934-937, 1997

11. Peralta C, Closa D, Xaus C, et al: Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 28: 768-773, 1998

12. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K et al: Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors. *Transplantation* 63: 369-373, 1997;

13. Tsukamoto S, Ohkohchi N, Fukumori T, et al: Elimination of Kupffer cells and nafamostat mesilate rinse prevent reperfusion injury in liver grafts from agonal non-heart beating donors. *Transplantation* 67: 1396-1403, 1999

14. Marubayashi S, Takenaka M, Dohi K, et al: Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. *Transplantation* 30: 294-296, 1980

15. Kono Y, Ozawa K, Tanaka J, et al: Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. *Transplantation* 33: 150-155, 1982;

16. Kamiike W, Watanabe F, Hashimoto T, et al: Changes in Levels of ATP and its catabolites in ischemic rat liver. *J Biochem* 91: 1349-1356, 1982

17. Watanabe F, Kamiike W, Nishimura T, et al: Decrease in mitochondrial levels of adenine nucleotides and concomitant mitochondrial dysfunction in ischemic rat liver. *J Biochem* 94: 494-499, 1983

18. Kamiike W, Nakahara M, Nakao K, et al: Correlation between cellular ATP level

and bile excretion in the rat liver. Transplantation 39: 50-55, 1985

19. Nishida T, Koseki M, Kamiike W, et al: Levels of purine compounds in a perfusate as a biochemical marker of ischemic injury of cold-preserved liver. Transplantation 44: 16-21, 1987;

20. Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, et al: Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. Transplantation 45: 138-143, 1988

21. Harvey PRC, Iu S, McKeown CMB, et al: Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. Transplantation 45: 1016-1020, 1988

22. Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, et al: Effect of anoxia on intracellular ATP, Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , and cytotoxicity in rat hepatocytes. J Biol Chem 267:6654-6663, 1992

23. Jaeschke H: Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284:15-26, 2003

24. Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW: Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. Transplant Proc 37:1653-1656, 2005

25. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, et al: Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. Ann Surg 239:220-231, 2004

26. Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR: Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated reperfused rat liver. J Clin Invest 81:1240-1246, 1988

27. Jaeschke H: Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. Chem Biol Interact 79:115-136, 1991

28. Ravanat JL, Di Mascio P, Martinez GR, et al: Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. J Biol Chem 276:40601-40604, 2000

29. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 312:159-163, 1985

30. Cutrin JC, Boveris A, Zingaro B, et al: *In situ* determination by surface chemiluminescence of temporal relationships between evolving warm ischemia-reperfusion injury in rat liver and phagocyte activation and recruitment. Hepatology 31:622-632, 2000

31. Semenza GL: Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. Circ. Res 86:117-118, 2000

32. Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, et al: Kupffer cells generate superoxide anions and modulate reperfusion injury in rat livers after cold preservation. Hepatology 25:356-360, 1997

33. Schauer RJ, Bilzer M, Kalmuk S, et al: Microcirculatory failure after rat liver transplantation is related to Kupffer cell-derived oxidant stress but not involved in early graft dysfunction. *Transplantation* 72:1692-1699, 2001
34. Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, et al: Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 21:1138-1143, 1995
35. Pannen BHJ, Bauer M, Noldge-Scho"mburg GFE, et al: Regulation of hepatic blood flow during resuscitation from hemorrhagic shock: role of NO and endothelins. *Am J Physiol* 272:2736-2745, 1997

A. 心停止ドナーからの肝グラフトに対する冷保存前灌流、
及びビリベルジン添加の効果の検討

研究方法

(1) 実験動物

体重 215~295g 雄性 Wister rat (日本エスエルシー) を用いて以下の 5 群を作成した (Figure 1)。

(a) コントロール群：心拍動下に肝を摘出し、即座に再灌流。

(b) 心拍動下グラフト (心拍動) 群：心拍動下に肝を摘出し、6 時間の冷保存後に再灌流。

(c) 心停止下グラフト (心停止) 群：開胸による呼吸停止から死戦期を経て心停止を誘導し、30 分間の温阻血をおいた後に肝を摘出。6 時間の冷保存後に再灌流。

(d) 冷保存前灌流 (前灌流) 群：心停止群と同様に肝を摘出後、30 分間の冷保存前灌流を施行。6 時間の冷保存後に再灌流。

(e) ビリベルジン (biliverdin : BV) 群：冷保存前灌流液に 10 μ mol の BV を投与。

各群とも N=5 とした。

(2) 手技

ペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内注入し全身麻酔を導入。正中切開にて開腹後、総胆管に内径 0.5mm のシリコンチューブを接続した 22G サーフロー針外筒を挿入。コントロール群では虚血の影響の無い正常肝を *ex vivo* 灌流系で灌流した時の状態を観察するために、心拍動下に門脈に 16G サーフロー針外筒を挿入し、肝上下部下大静脈切開による脱血後、全肝を摘出。即座に再灌流を行った。心拍動群では、心拍動下に門脈カニューレション、脱血後、4°C University of Wisconsin (UW) 液 20ml にて門脈血を wash out した後全肝を摘出し、4°C UW 液中に冷保存した。心停止群、前灌流群、BV 群では、胆管カニューレション後、経腹腔的に横隔膜を切開、呼吸停止から死戦期を経た心停止を誘導した。心室拍動の停止を心停止と判定し、開胸から心停止までの時間は Table 2 に示す通りで各群間に有意差は認めなかった。心停止後、30 分間の温阻血を置き、心拍動群と同様の手順で全肝を摘出。その後、心停止群は 4°C UW 液中に冷保存し、前灌流群、BV 群では 30 分間の冷保存前灌流を施行した後 4°C UW 液で門脈を wash out し、4°C UW 液中に冷保存した。

(3) 灌流方法

Oikawa らが使用した回路¹に若干の修正を加え、開放回路とし再灌流を行った (Figure 2)。冷保存前灌流、冷保存後再灌流とも 95%O₂/5%CO₂ で飽和した 37°C のクレプス-ヘンゼライト液を用いて経門脈的に 10 cm H₂O の灌流圧にて施行。冷保存後再灌流は 60 分間とした。60 分間の再灌流中、胆汁、及び肝静脈から流出する灌流液を回収し後述する検討に用いた。再灌流後、直ちに肝を 4°C の lactate

ringer 液 20ml で wash out し、組織学的検討用の組織片を採取し、残りの肝組織を freeze clamp したうえで - 80℃で保存した。

(4) ビリベルジン添加方法

Biliverdin dihydrochloride (MP Biomedicals, California) を遮光下に 2 mmol/L NaOH で溶解し、2.5 μ mol/ml の BV 溶液を作成、-20℃で暗保存。使用直前に溶解し、lactate ringer 液で 0.5 μ mol/ml に希釈。30 分間の冷保存前灌流中に、遮光下に回路側管よりシリンジポンプを用いて 40ml/h の速度で持続投与し、BV として 10 μ mol を投与した。

(5) 検討項目

1) 門脈灌流量

60 分間の再灌流中に肝静脈から流出した灌流液を回収し、肝重量当たりの門脈灌流量を算出した。

2) 胆汁産生量

60 分間の再灌流中に総胆管から排出された胆汁を回収し、肝重量当たりの胆汁産生量を算出した。

3) Energy status

検体は、心拍動群・心停止群・前灌流群では冷保存直前、6 時間の冷保存後、1 時間の再灌流後の 3 回、コントロール群・BV 群では 1 時間の再灌流後のみ採取した (Figure 1)。

Tsukamoto らの方法²に若干の修正を加えて肝組織中の ATP、ADP、AMP 量を測定した。即ち、液体窒素を用いて freeze clamp し - 80℃で保存した肝組織を 0.5N 過塩素酸中で POLYTRON PT3100 (KINEMATICA AG, Luzern, Switzerland)を用いて破碎した後、1500rpm×5 分、冷却遠心し、上清を回収。さらに 3000rpm×10 分、冷却遠心した後に回収した上清を水酸化カリウム、過塩素酸を用いて pH6.0~7.6 に滴定しアデニンヌクレオチドを抽出した。その後、3000rpm×10 分、冷却遠心し、上清 1ml を回収。孔径 0.45 μ m セルロースアセテートメンブレンフィルター (03CP045AS; Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan) を通して遠心タイプセルロース膜限外濾過カートリッジ (ULTRACENT30; TOSOH, Tokyo, Japan) に注入、3000rpm×30 分、冷却遠心し濾過されたものを -20℃で保存し、測定時に解凍させたものを検体とした。4℃下で 60mM リン酸緩衝液 (pH5.0) を溶出液とし、1.0ml/min の流量で Wakosil-II 5C18HG column を使用して、high-performance liquid chromatography (HPLC) 法を用いて検体中の ATP、ADP、AMP 量を測定した (Jusco HPLC analyzer system Gilliver900 series, UV970, Jusco, Tokyo, Japan)。Adenosine 5'-triphosphate sodium salt、Adenosine 5'-diphosphate sodium salt、Adenosine 5'-monophosphate sodium salt (Sigma-Aldrich corporation, St. Louis, Missouri) を 10 μ mol/l に調製したものをスタンダードとし、

検体 20 μ l 中の ATP、ADP、AMP 量（スタンダードは 200pmol）を測定した後、肝組織当たりの mol 数（ μ mol/g）を算出した。Energy charge は（ATP+0.5ADP）/（ATP+ADP+AMP）で計算した。

4) 再灌流液中 AST（Aspartate aminotransferase）濃度

回収した再灌流液中の AST 濃度を酵素比色法にて測定した（TA-S; Nittobo, Fukushima, Japan）。

5) 炎症性サイトカイン

回収した再灌流液中の tumor necrosis factor α （TNF- α ）濃度を enzyme linked-immuno-sorbent assay（ELISA）kit（BioSource Rt TNF- α kit; BioSource International, Inc., Camarillo, California）を用いて測定した。

6) 組織学的検討

60 分間の再灌流後、直ちに肝を 4°C の lactate ringer 液 20ml で wash out し、肝の異なった 5 箇所から組織片を採取し 10%ホルマリンで固定した後パラフィン包埋した。

a. ヘマトキシリン・エオジン染色

3 μ m 切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡にて組織学的検討を行った。また、肝微小循環の評価のために、開存している類洞腔の面積の割合を算出した。即ち、100 倍拡大にて 1 切片につき 10 箇所をランダムに選択し、Photoshop（Adobe Systems Inc., San Jose, California）を用いて開存している類洞腔を抽出し、Scion Image（Scion Corporation, Frederick, Maryland）を用いて類洞腔面積 /（観察部位面積—門脈又は肝静脈内腔面積）を計算した。1 個体につき 5 切片を検討し、1 個体あたり 50 カ所の類洞開存面積率を計算した。

b. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling（TUNEL）染色

アポトーシスの検出のために、各ラットにつき 3 箇所の組織検体に対し、In Situ Cell Death Detection Kit, POD（Roche, Germany）を用いて TUNEL 染色を行った。切片全体の TUNEL 陽性細胞数、切片全体の面積を計測し、切片 1mm² 当たりの陽性細胞数を算出した。

7) 肝組織中 malondialdehyde（MDA）

MDA は細胞傷害によって生じた過酸化脂質が分解されて生じ、酸化ストレスの指標として広く用いられている³。肝組織中 MDA 測定は Bioxytech MDA 586 assay kit（Oxis International Inc, Portland, OR）を用いて行った。検体の作成は Gerhard らの方法⁴に沿って行った。即ち、-80°C にて保存した肝組織約 200mg を 5mM の butylated hydroxytoluene（BHT）含 20mM Tris buffer（pH7.4）700 μ l 中で Digital homogenizer（iuchi 現 AS ONE CORPORATION, Osaka, Japan）を用いてホモジェナイトし、3000g \times 10 分、4°C で冷却遠心後、上清を -80°C で保存した。

4。

測定時、解凍した検体に BHT、HCl を加え pH1~2 とし 60℃ で 80 分間定温放置し、蛋白と MDA の結合を加水分解させた。続いて diluted MDA 586 Reagent R1 (N-methyl-2-phenylindole in 25% methanol/75% acetonitrile) を加え混和し 13000g×5 分遠心。上清に HCl を加え 45℃ で 60 分間定温放置した後、13000g×5 分遠心し、上清を回収。586nm で吸光度を測定した。スタンダード直線は 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMOP) を 45℃、60 分間の定温放置で加水分解し MDA を産生させ、作成した。

Lowry 法 (DC protein assay, Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA) を用いて同検体の蛋白濃度を測定し蛋白量当たりの MDA 量 (nmol/g protein) を算出した。

(6) 統計学的処理

測定結果は mean ± standard deviation (SD) で示した。各群間の比較は Mann Whitney の U 検定を施行し、P<0.05 を有意差ありとした。

研究結果

(1) 門脈灌流量

心停止群ではコントロール群、心拍動群と比べ有意に門脈灌流量が減少したが、前灌流群により心拍動群と同等まで改善した (Figure 3)。BV 添加による効果は明らかではなかった。

(2) 胆汁産生量

心停止群では、著しい胆汁産生量の低下を来した。それが、前灌流により有意差を持って改善したが、BV 添加ではその改善効果が認められなかった (Figure 4)。

(3) Energy status

1) Energy charge

いずれの群においても冷保存前から冷保存後にかけて緩やかに減少し、再灌流によって冷保存前値以上に回復した。前灌流群では冷保存前の energy charge が心停止群よりも有意に高く、冷保存前灌流による energy charge の改善が認められた。その効果は 6 時間の冷保存を経ても持続し冷保存後も心停止群よりも有意に高値を示した (Figure 5, Table3)。

再灌流後の energy charge では、前灌流により心停止群に比べ有意に改善し、BV 添加により更に改善し、付加効果が認められた (Figure 6, Table 3)。

2) 肝組織中 ATP 量

各群とも冷保存前から冷保存後にかけて減少し、再灌流によって冷保存前値以上に回復した。前灌流群では冷保存前の肝組織中 ATP 量が心停止群よりも有意に高く、冷保存前灌流による改善が認められた。その効果は 6 時間の冷保存

を経ても持続し、冷保存後も前灌流群は心停止群と比べ有意に改善が見られた (Figure 7, Table 4)。

再灌流後の肝組織中 ATP 量はコントロール群と比べ心拍動群で有意に減少し、心停止群では更に減少していた。前灌流群は心停止群と比べ有意に高値で酸化的リン酸化能の改善が見られ、BV 群では更に改善しコントロール群と同等であった (Figure 8, Table 4)。

(4) 再灌流液中 AST 濃度

コントロール群、心拍動群と比べ温阻血を経た心停止群、前灌流群、BV 群では有意に高値を示し、心停止肝グラフトが再灌流後に強い細胞傷害を受けることが示唆された。前灌流群は心停止群と比較して低い傾向にあったが、有意差は見られなかった。BV 群では心停止群と比較して有意に低値を示し、細胞傷害の軽減が見られた (Figure 9)。

(5) 炎症性サイトカイン TNF- α 濃度

コントロール群、心拍動群と比べ温阻血を経た心停止群、前灌流群では有意に高値であったが、BV 群では心停止群、前灌流群と比し有意に低値で炎症反応の軽減が見られた (Figure 10)。

(6) 組織学的所見

1) Hematoxylin and eosin 染色

心拍動群では類洞構造は保たれており、コントロール群 (Figure 11A) と比べ肝細胞の腫脹が軽度見られているが空胞変性は見られなかった (Figure 11B)。心停止群では肝細胞の腫脹、類洞内皮細胞の脱落による類洞腔の狭小化や肝細胞の空胞変性が広範囲に認められた (Figure 11C)。前灌流群、BV 群では心停止群と比べ、類洞腔の狭小化は軽減し (Figure 11D-1、11E-1)、空胞変性も区域性的に見られたが心停止群よりは軽減していた (Figure 11D-2、11E-2)。

開存している類洞腔の面積の割合は、前灌流群、BV 群では心停止群に比し有意に高値で改善が見られ、心拍動群と同等であった (Figure 12)。

2) TUNEL 染色

TUNEL 陽性細胞は心停止群、前灌流群で多く、BV 群では心拍動群と同程度までアポトーシス細胞の軽減傾向が見られたが、これら 4 群間で有意差は見られなかった (Figure 13)。

(7) 肝組織中 malondialdehyde (MDA)

各群間に有意差は見られなかったが、前灌流群、BV 群で低い傾向にあった (Figure 14)。

考察

今回我々は、死戦期を経て 30 分間の温阻血をおいた肝グラフトに対し、酸素

化された 37°C の buffer を用いて 30 分間の冷保存前灌流を行い energy status に与える影響を調べるとともに、その影響が再灌流後のグラフト機能の改善、障害の軽減につながるかを検討した。その結果、冷保存前灌流により energy charge、肝組織中 ATP 量とも改善が認められた。その効果は冷保存を経ても保たれ、前灌流群では再灌流中の門脈灌流量、胆汁産生量、肝組織中 ATP 量、energy charge (energy status) が改善された。前灌流液への BV 添加は、energy status において更なる改善効果を示した。また、再灌流液中の AST、TNF- α 濃度は BV 添加により有意に低下した。病理所見では、類洞の狭小化、肝細胞の空胞変性が前灌流又は BV により緩和され、BV 添加により TUNEL 陽性細胞の減少傾向が認められた。肝組織中 MDA (脂質過酸化反応) は前灌流及び BV 添加により低下傾向を示した。

Energy charge は代謝の維持、進行に重要であり、肝の viability の指標として用いられてきている^{5,6}。また、動物実験^{7,8,9}のみならず臨床での移植肝における検討¹⁰でも、再灌流後の ATP の再産生能、即ち再灌流後の肝組織中 ATP 量はグラフト viability の指標になるとされている。今回、冷保存前灌流によって心停止グラフトで再灌流後の energy charge、肝組織中 ATP 量の改善が見られたことは、冷保存前灌流によって回復した酸化的リン酸化能によって再灌流後に ATP の産生が行われ、グラフトの viability 改善につながる可能性が示唆された。

類洞腔の狭小化は肝細胞の空胞変性、腫脹、類洞内皮細胞の脱落によって起こり^{5,11} 門脈血流の低下¹²、ひいては肝微小循環の悪化をもたらす。Ex vivo の実験系では肝微小循環は門脈灌流量によって表されるが、今回、冷保存前灌流によって再灌流時の門脈流量の改善が得られ、これに関連して病理標本で計測した類洞面積の狭小化にも軽減が得られた。Energy status と肝微小循環の関係の詳細は明らかではないが、再灌流後の energy status が改善したことにより ATPase 依存性ポンプの機能が保たれ、肝細胞の膨化、空胞変性が抑えられた可能性が考えられる。ただ、Tsukamoto らは、ATP 合成の正常化は肝移植の成功に必要なはあるが、十分ではないと述べており²、energy status の改善以外の因子が肝微小循環の改善に寄与した可能性もあり、更なる検討が必要である。

胆汁産生能はグラフト機能のパラメーターであるとともに、組織内の ATP 量を反映すると報告されている^{10,13}。我々の実験では冷保存前灌流により胆汁産生量の有意な上昇が見られ、energy status とともにグラフト機能の改善が示唆された。

虚血下に置かれた臓器は再酸素化を受けることにより虚血再灌流障害を被ることが知られている。今回の実験では冷保存前灌流を行うことにより温阻血後の冷保存前灌流、冷保存後の再灌流と 2 度の虚血・再灌流を受けることから再灌流障害が増悪する可能性も考えられた。一般に温阻血に続く再灌流障害は、

再灌流から2時間以内に起こり、主にクッパー細胞による reactive oxygen species の産生・放出に伴う酸素化ストレスが特徴的な initial phase と、再灌流から6~48時間後に起こり好中球を介した炎症反応が主体をなす late phase の2つの相に分けられるとされる^{14~17}。今回の実験における冷保存前灌流は灌流時間が30分間であることから initial phase の再灌流障害が関与したグラフト障害が生じる可能性は否定できない。しかし、我々は、動物実験の移植モデルにおいてクッパー細胞の除去がレシピエントの生存率向上に必ずしも寄与しなかった^{2,18} こと、その一方で energy status がグラフト viability の指標となり^{9,10}、レシピエントの生存率とも関連している^{7,8} ことから、energy status を改善させることに注目し、冷保存前灌流を施行した。その結果、前灌流群において、再灌流後の細胞傷害の増悪、グラフト機能の低下といった再灌流障害の増強を思わせる所見は認められなかった。しかし、今回の実験では、血球成分を含まない buffer を用いて再灌流を行っていることや再灌流時間も1時間と短いことから、冷保存前灌流のグラフトに対する長期的な影響、あるいは実際に移植された場合の有効性については今後の検討課題となった。

BV は heme oxygenase (HO) によりヘムが分解されることにより CO、Fe²⁺ とともに産生されビリベルジンレダクターゼによりビリルビンに分解される。HO の生理学的効果を担うとされ¹²、ビリルビンとともに内因性の抗酸化物質として働く¹⁹。また、サイトカイン抑制効果のほか、ドナーへの術前投与、または再灌流液内への付加によって冷保存後の肝グラフトにおいても機能改善やアポトーシスの減少、レシピエント生存率の上昇が報告されている¹²。

今回の結果では冷保存前灌流中への BV 添加により energy status 改善の付加効果が認められ、グラフト viability の改善に寄与する可能性が示唆された。しかしながら、再灌流時の門脈灌流量で示されるグラフトの微小循環は BV 群と前灌流群で同等であり BV による付加効果は認められず、また、BV 群の胆汁産生量は前灌流群と比し有意に少なく心停止群と同等であった。その原因は明らかではないが、Kato らのビリルビンを用いた実験では、冷保存後の肝グラフトに対する少量・短時間のビリルビンの投与がグラフトの胆汁産生量の改善、再灌流障害の軽減をもたらすのに対し、長時間の投与により胆汁産生量が減少し細胞障害も悪化することが示されており、その原因を肝に蓄積したビリルビンの細胞毒性にあるとしている²⁰。一方、Fondevila らは冷保存後の肝グラフトに対する実験で、ex vivo での2時間の再灌流中に BV を投与し胆汁産生量、細胞障害とも改善が見られ BV による毒性はなかったと報告している¹²。今回の実験でも、再灌流時の細胞障害に関しては前灌流群と比べ軽減しており BV の毒性による影響は考えにくい。しかし、今回の実験は死戦期・温阻血を経た肝グラフトに BV を投与した点が Fondevila らの実験とは異なっている。主に冷阻血下では類

洞内皮細胞が、温阻血下では肝細胞が障害されることが知られている^{7,11,21}。従って、BVの代謝の場である肝細胞が温阻血障害を被ったことにより、投与されたBVを処理できず、特に胆汁産生量に関しては前灌流群と比し減少するという結果がもたらされたとも考えられるが、この点に関しては今後の検討課題となった。

今回の結果からは、冷保存前灌流のみでは組織標本での肝細胞の空胞変性の軽減及び肝組織中MDA値の低下傾向が見られたものの、灌流液中のAST、TNF- α 濃度で表される細胞傷害、炎症反応の有意な軽減は見られなかった。これらの細胞傷害、炎症反応は温阻血・再灌流障害によって惹起されたと考えられるが、BV添加によって有意な軽減が見られた。これはBVの抗酸化作用、サイトカイン抑制作用によると考えられるが、細胞傷害の軽減により細胞のネクロシスが軽減され、また、TNF- α は肝細胞のアポトーシスを誘導する^{22,23}ことから、サイトカイン抑制作用によるTNF- α の低下がTUNEL陽性細胞の減少傾向、即ちアポトーシスの軽減に寄与し、組織としてのenergy statusの改善につながったものと考えられた。

結論

心停止肝グラフトに対する冷保存前灌流はグラフトのenergy status、及びviabilityの改善に有効であった。また、冷保存前灌流にビリベルジンを付加することにより更なるviabilityの改善とともに、再灌流障害が軽減される可能性が示された。

参考文献

1. Oikawa K, Ohkohchi N, Sato M, et al: The effects of the elimination of Kupffer cells in the isolated perfused liver from non-heart beating rat. *Transpl Int* 13: S573-S579, 2000
2. Tsukamoto S, Ohkohchi N, Fukumori T, et al: Elimination of Kupffer cells and nafamostat mesilate rinse prevent reperfusion injury in liver grafts from agonal non-heart beating donors. *Transplantation* 67: 1396-1403, 1999
3. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, et al: Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11: 1176-1183, 1998
4. Gerhard GS, Kaufmann EJ, Wang X, et al: Genetic differences in hepatic lipid potential and iron levels in mice. *Mech Ageing Dev* 123: 167-176, 2002
5. Tsukamoto S, Ohkohchi N, Fukumori T, et al: Elimination of Kupffer cells and

- nafamostat mesilate rinse prevent reperfusion injury in liver grafts from agonal non-heart beating donors. *Transplantation* 67: 1396-1403, 1999
6. Kono Y, Ozawa K, Tanaka J, et al: Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. *Transplantation* 33: 150-155, 1982
 7. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K et al: Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors. *Transplantation* 63: 369-373, 1997;
 8. Marubayashi S, Takenaka M, Dohi K, et al: Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. *Transplantation* 30: 294-296, 1980
 9. Kamiike W, Watanabe F, Hashimoto T, et al: Changes in Levels of ATP and its catabolites in ischemic rat liver. *J Biochem* 91: 1349-1356, 1982
 10. Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, et al: Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation* 45: 138-143, 1988
 11. McKeown CMB, Edwards V, Phillips MJ, et al: Sinusoidal lining cell damage: The critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 46: 178-191, 1988
 12. Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, et al: Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 40:1333-1341, 2004
 13. Kamiike W, Nakahara M, Nakao K, et al: Correlation between cellular ATP level and bile excretion in the rat liver. *Transplantation* 39: 50-55, 1985
 14. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW: Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 4: 3355-3359, 1990
 15. Jaeschke H, Farhood A: Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 260: G355-G362, 1991
 16. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, et al: Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 32: 169-173, 2000
 17. Teoh NC, Farrell GC: Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 891-902, 2003
 18. Imamura H, Sutto F, Brault A, et al: Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology* 109: 189-197, 1995
 19. Katori M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW: Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 74: 905-912, 2002
 20. Kato Y, Shimazu M, Kondo M, et al: Bilirubin rinse: A simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning. *Hepatology* 38:

364-373, 2003

21. Reddy S, Zilveti M, Brockmann J, et al: Liver transplantation from non-heart-beating donors: Current status and future prospects. *Liver Transpl* 10: 1223-1232, 2004

22. Uehara T, Bennett B, Sakata ST, et al: JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol* 42: 850-859, 2005

23. Ben-Ari Z, Hochhauser E, Burstein I, et al: Role of anti-tumor necrosis factor- α in ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver in a blood-free environment. *Transplantation* 73: 1875-1880, 2002

Table 1. Energy chargeの推移.

| | 冷保存前 | 冷保存後（再灌流直前） | 再灌流後 |
|------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 心拍動群 | 0.273 ± 0.0484^a | 0.176 ± 0.0400^a | 0.358 ± 0.0525 |
| 心停止群 | 0.157 ± 0.0405 | 0.117 ± 0.0094 | 0.363 ± 0.0250 |
| 前灌流群 | 0.289 ± 0.0256^a | 0.241 ± 0.0313^a | 0.410 ± 0.0280^a |

a:P<0.05 vs. 心停止群

Table 2. 肝組織中ATP量 (μmol/g)の推移.

| | 冷保存前 | 冷保存後（再灌流直前） | 再灌流後 |
|------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 心拍動群 | 0.469 ± 0.1606^a | 0.191 ± 0.0470^a | 0.548 ± 0.1577 |
| 心停止群 | 0.108 ± 0.0121 | 0.080 ± 0.0202 | 0.371 ± 0.0573 |
| 前灌流群 | 0.303 ± 0.0548^a | 0.237 ± 0.0663^a | 0.519 ± 0.0897^a |

a:P<0.05 vs. 心停止群

Figure 1. 実験プロトコル.

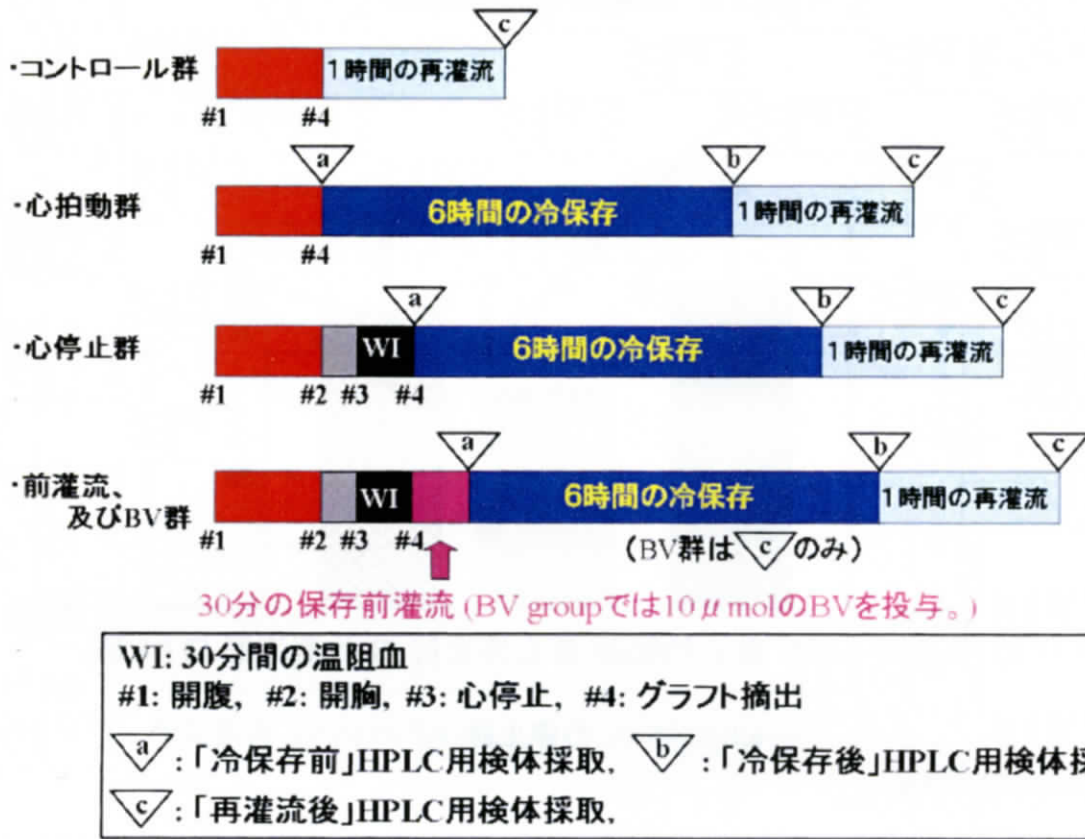


Figure 2. Ex vivo 還流モデル: 肝Graftは酸素化された 37°C のクレブス-ヘンゼライト液にて経門脈的に灌流される。

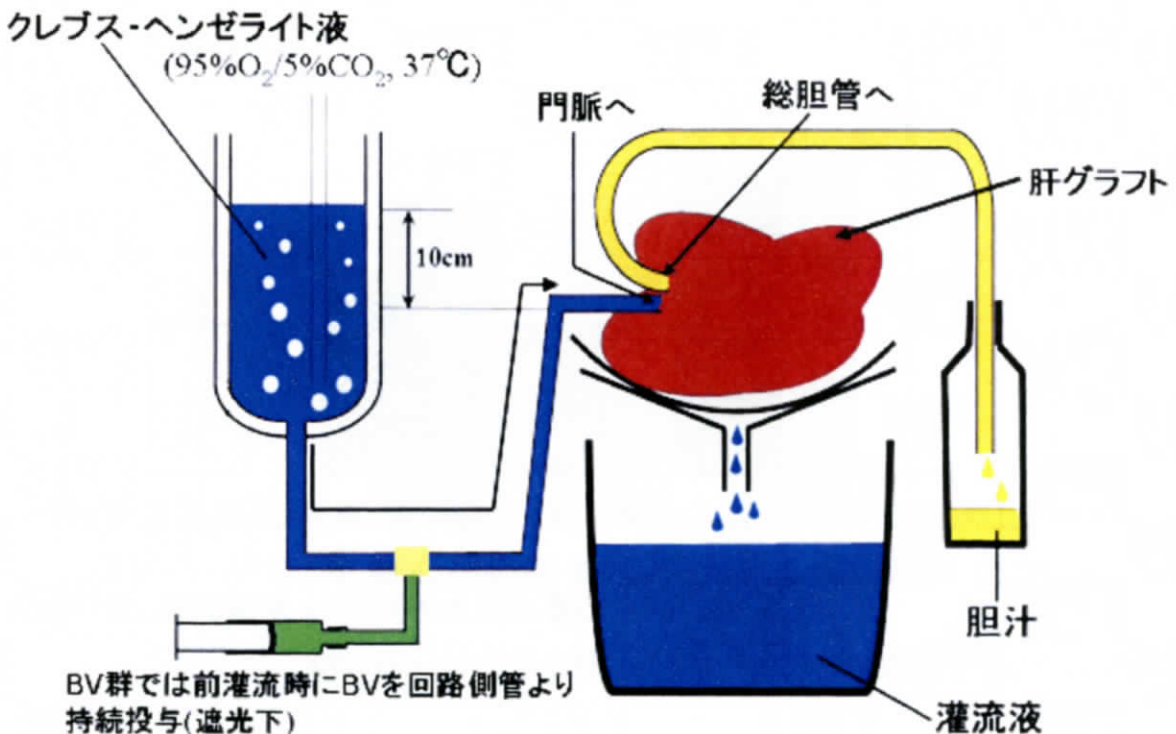
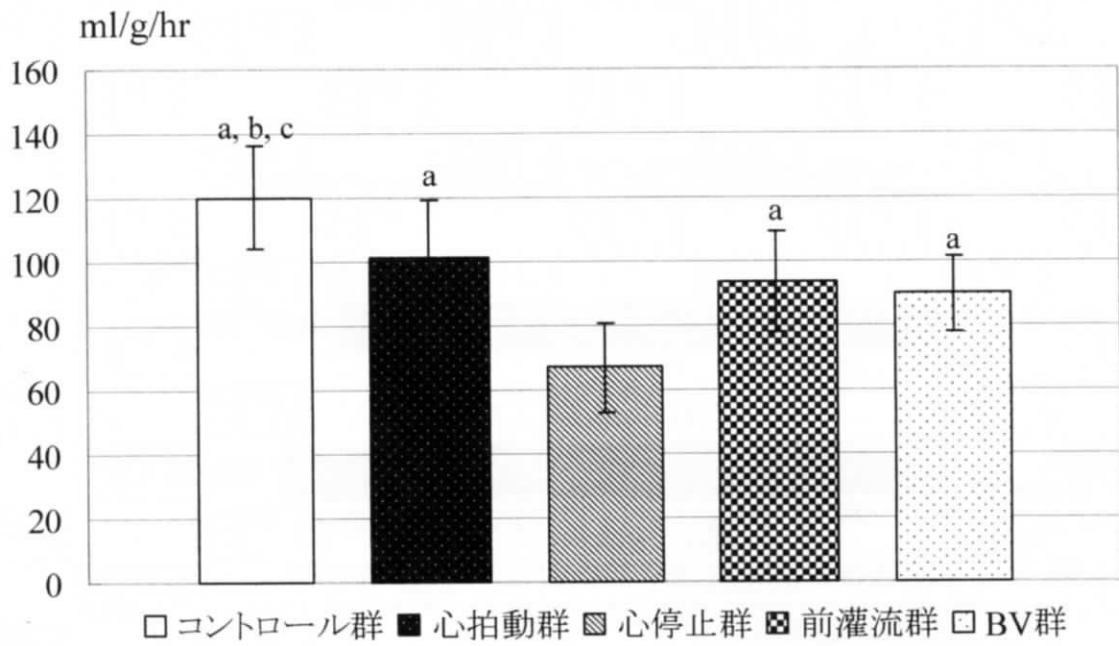
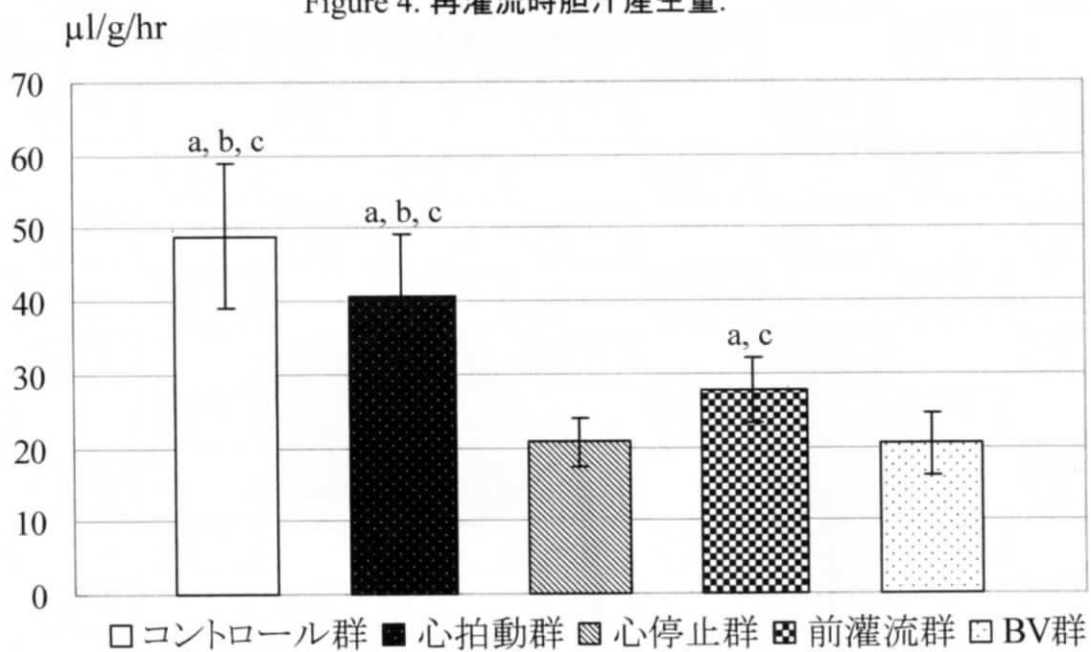


Figure 3. 再灌流時門脈灌流量.



a: $P < 0.05$ vs. 心停止群, b: $P < 0.05$ vs. 前灌流群, c: $P < 0.05$ vs. BV群

Figure 4. 再灌流時胆汁産生量.



a: $P < 0.05$ vs. 心停止群, b: $P < 0.05$ vs. 前灌流群, c: $P < 0.05$ vs. BV群

Figure 5. Energy chargeの推移.

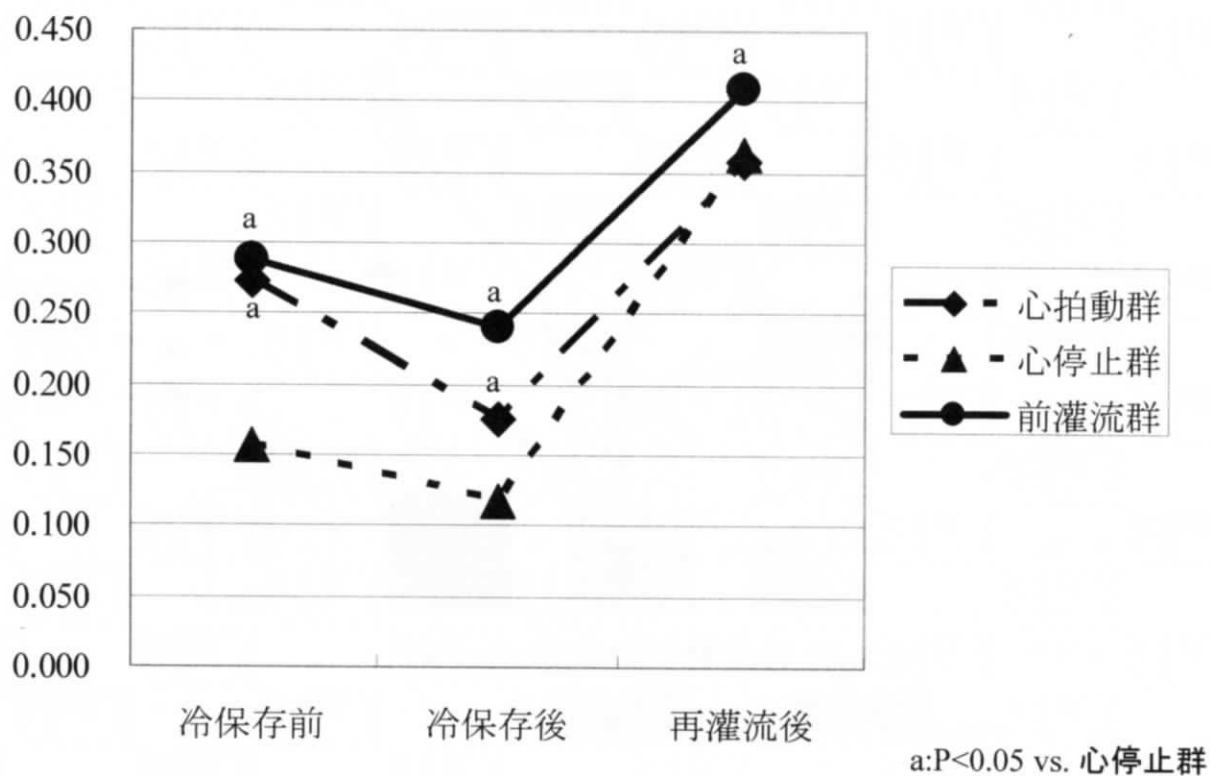


Figure 6. 再灌流後のenergy charge.

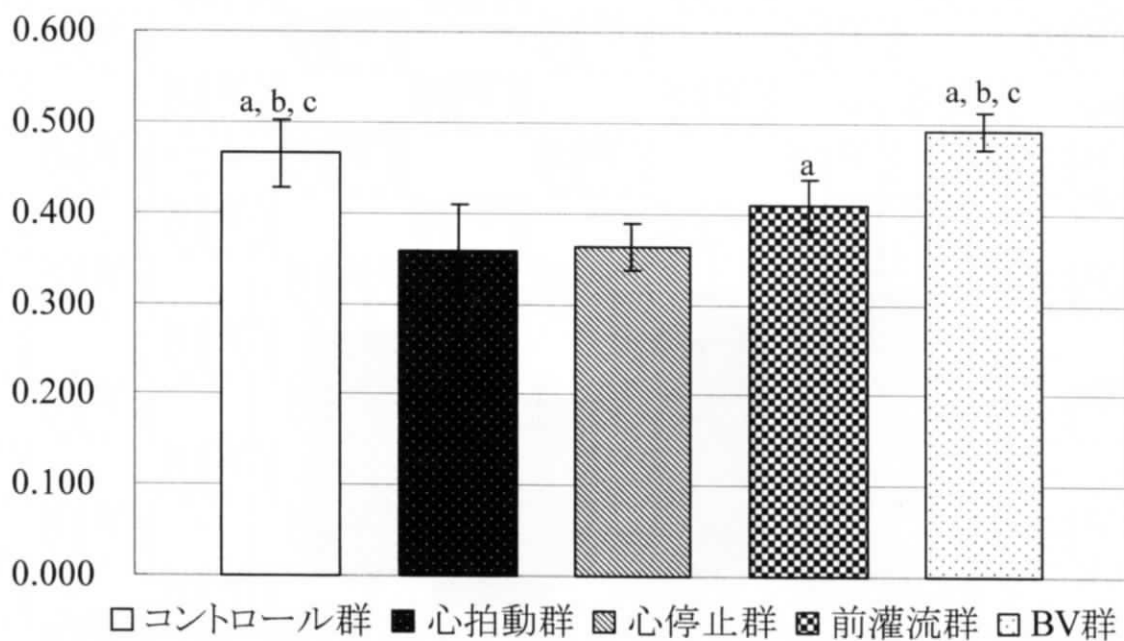


Figure 7. 肝組織中 ATP量の推移.

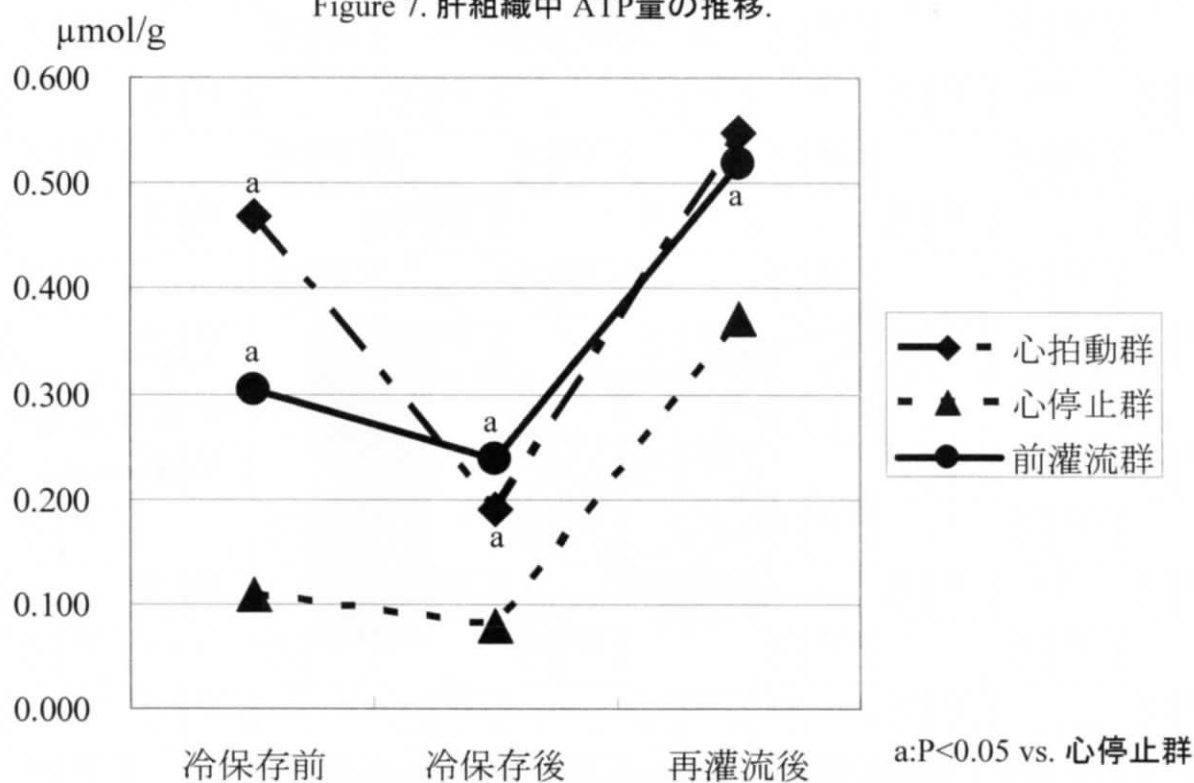
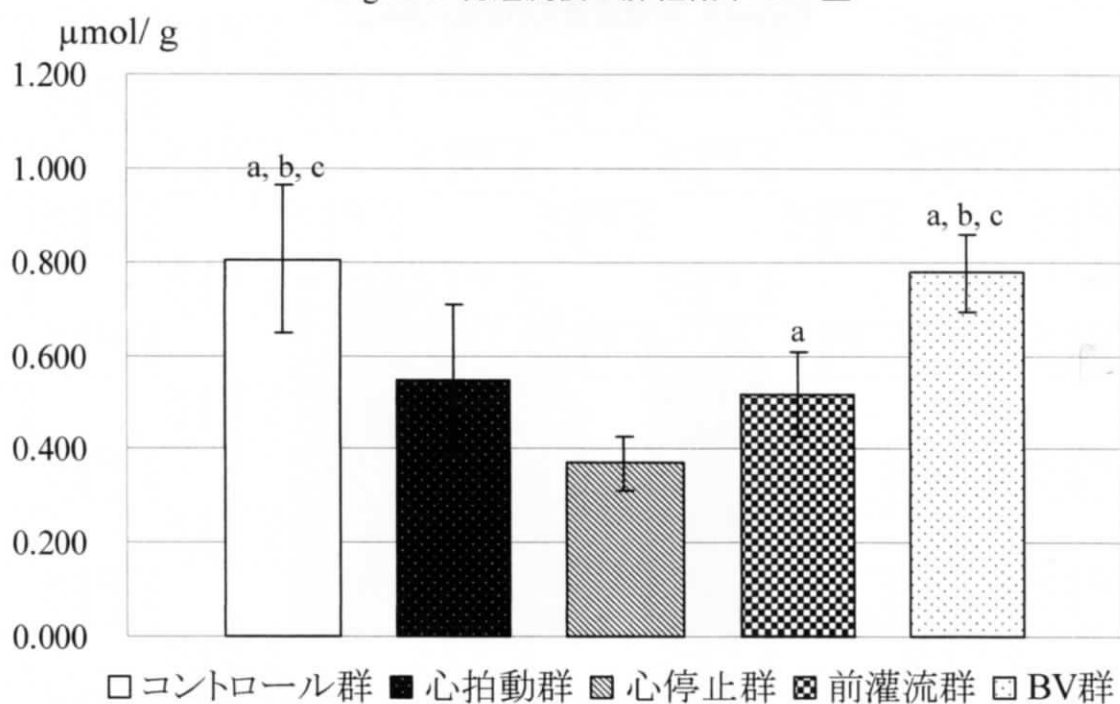
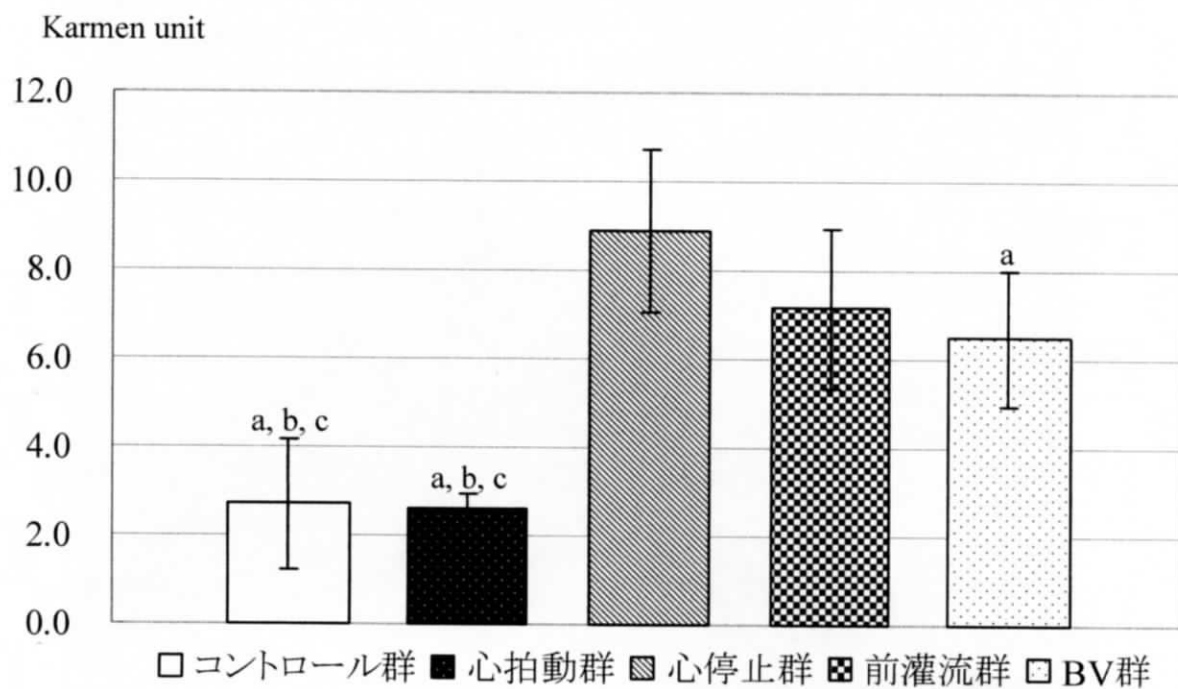


Figure 8. 再灌流後の肝組織中ATP量.



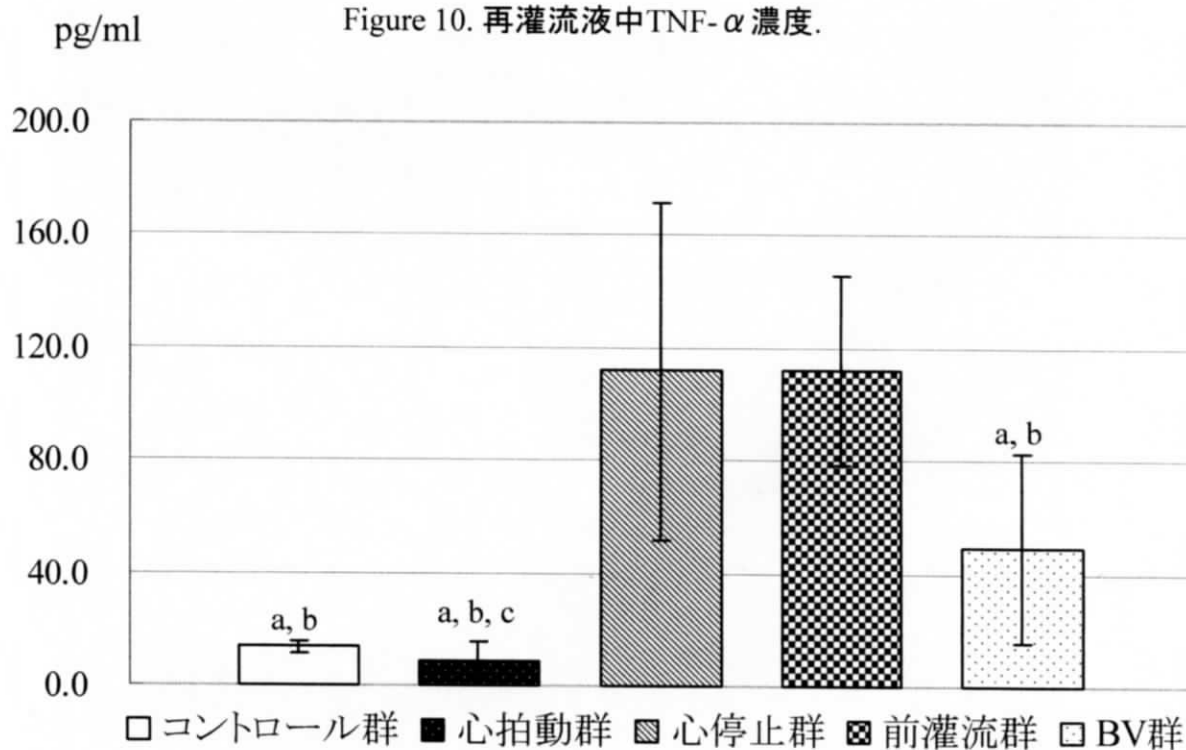
a:P<0.05 vs. 心停止群, b:P<0.05 vs. 心拍動群, c:P<0.05 vs. 前灌流群

Figure 9. 再灌流液中AST濃度.

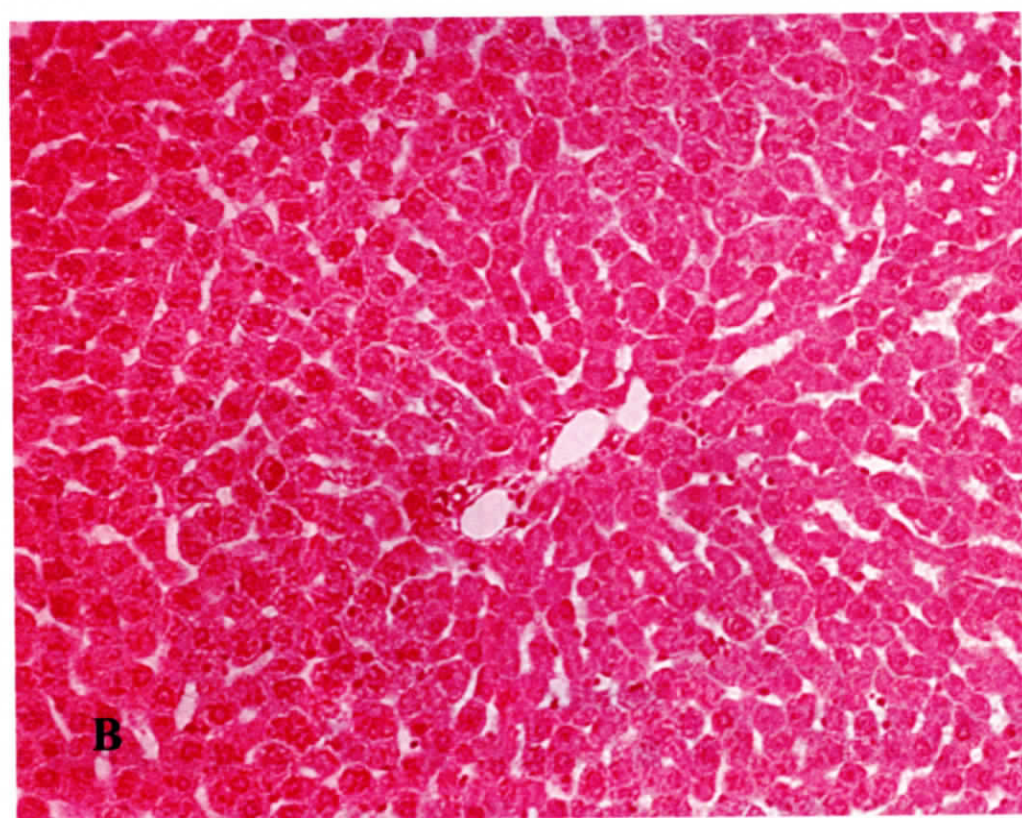
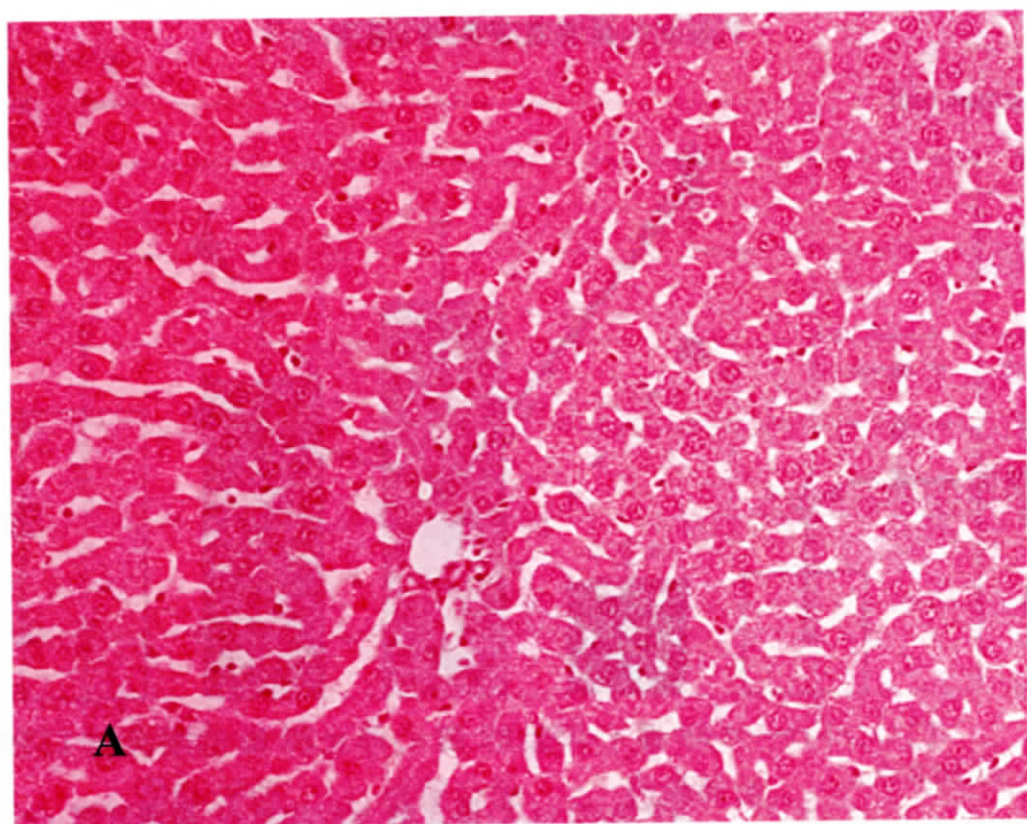


a:P<0.05 vs. 心停止群, b:P<0.05 vs. 前灌流群, c:P<0.05 vs. BV群

Figure 10. 再灌流液中TNF- α 濃度.



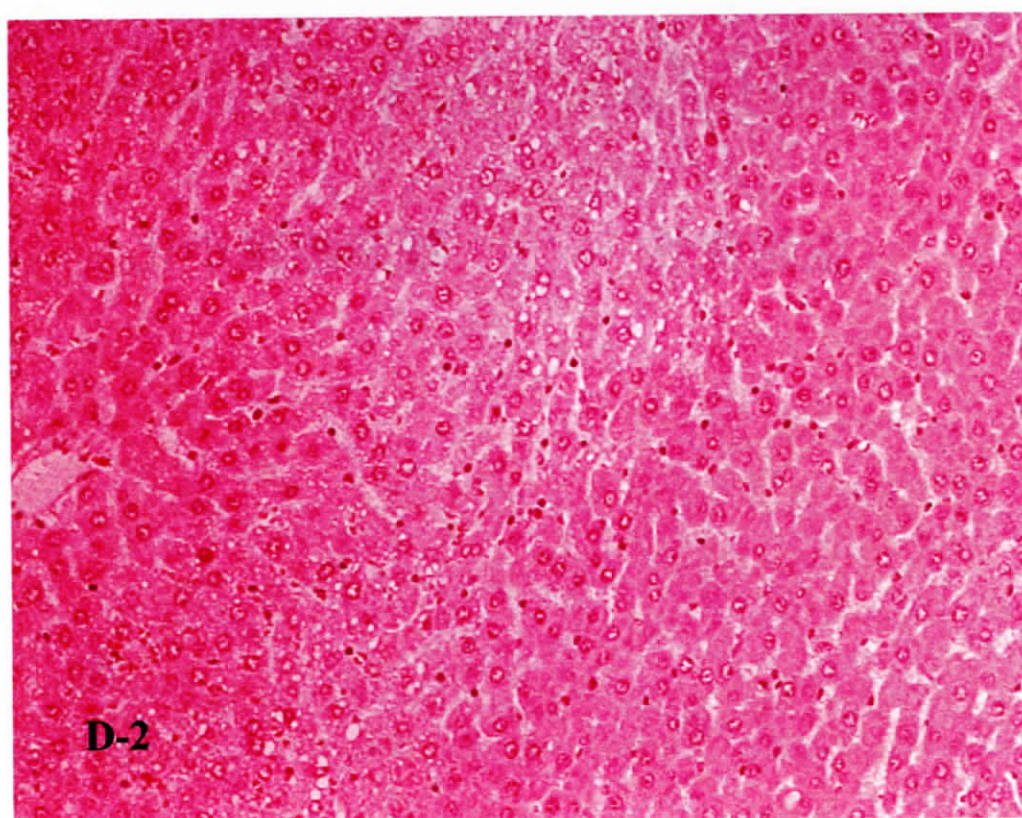
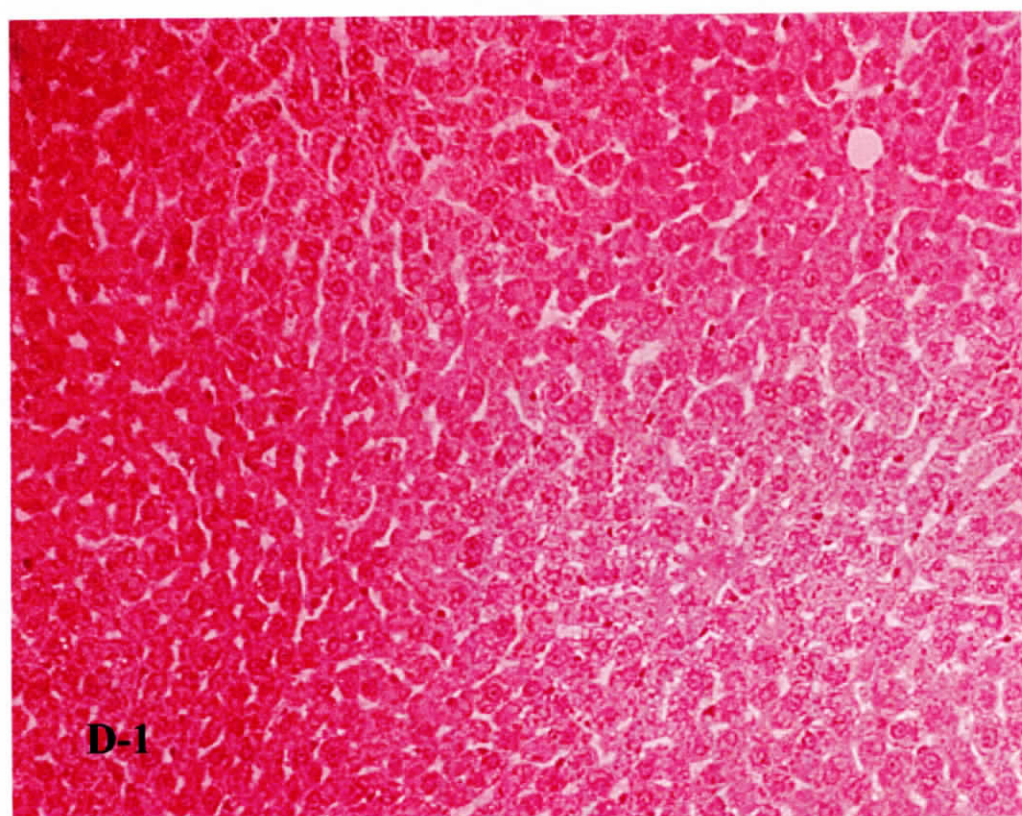
a:P<0.05 vs. 心停止群, b:P<0.05 vs. 前灌流群, c:P<0.05 vs. BV群





空胞変性

類洞腔狭小化



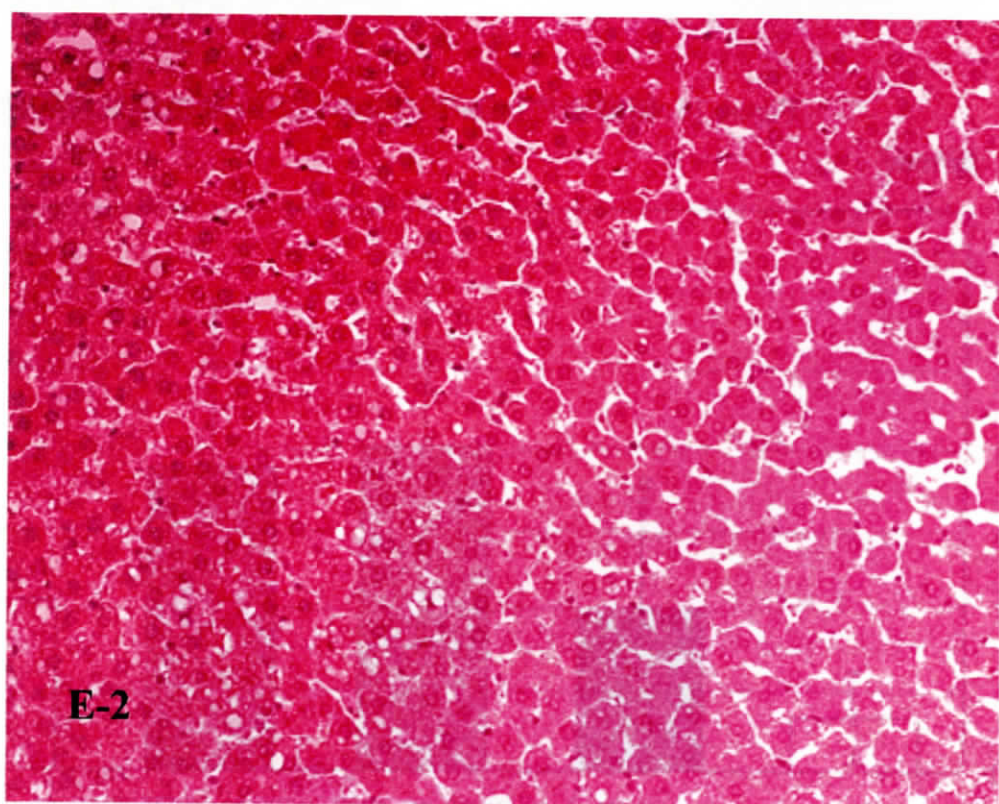
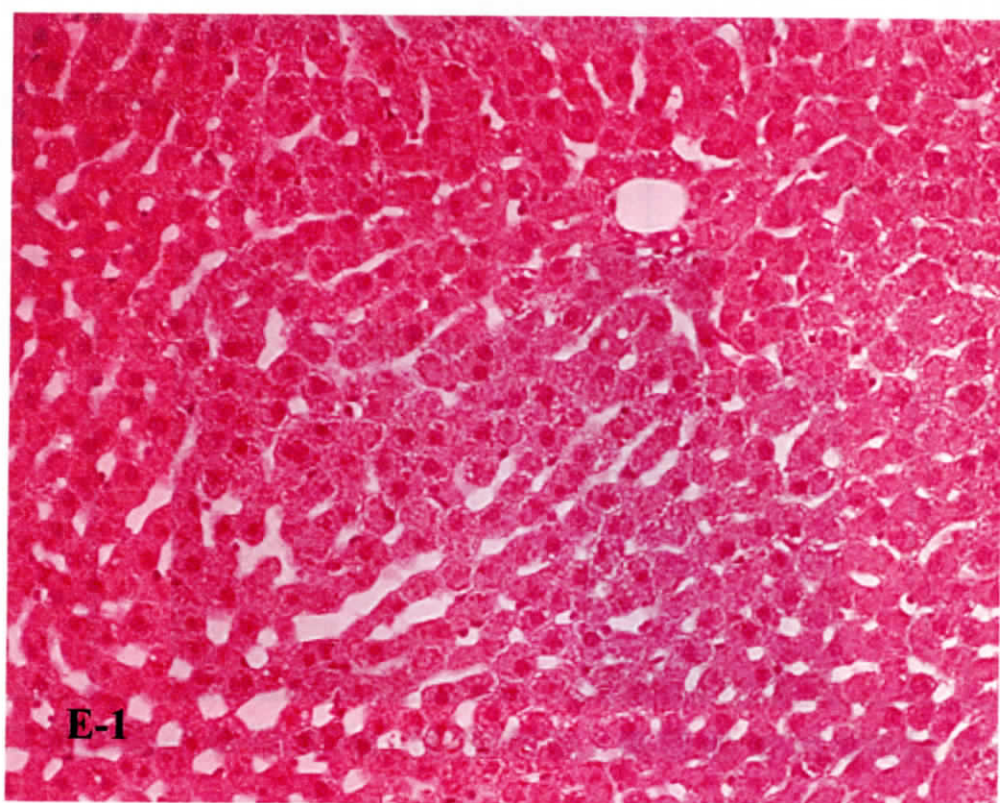
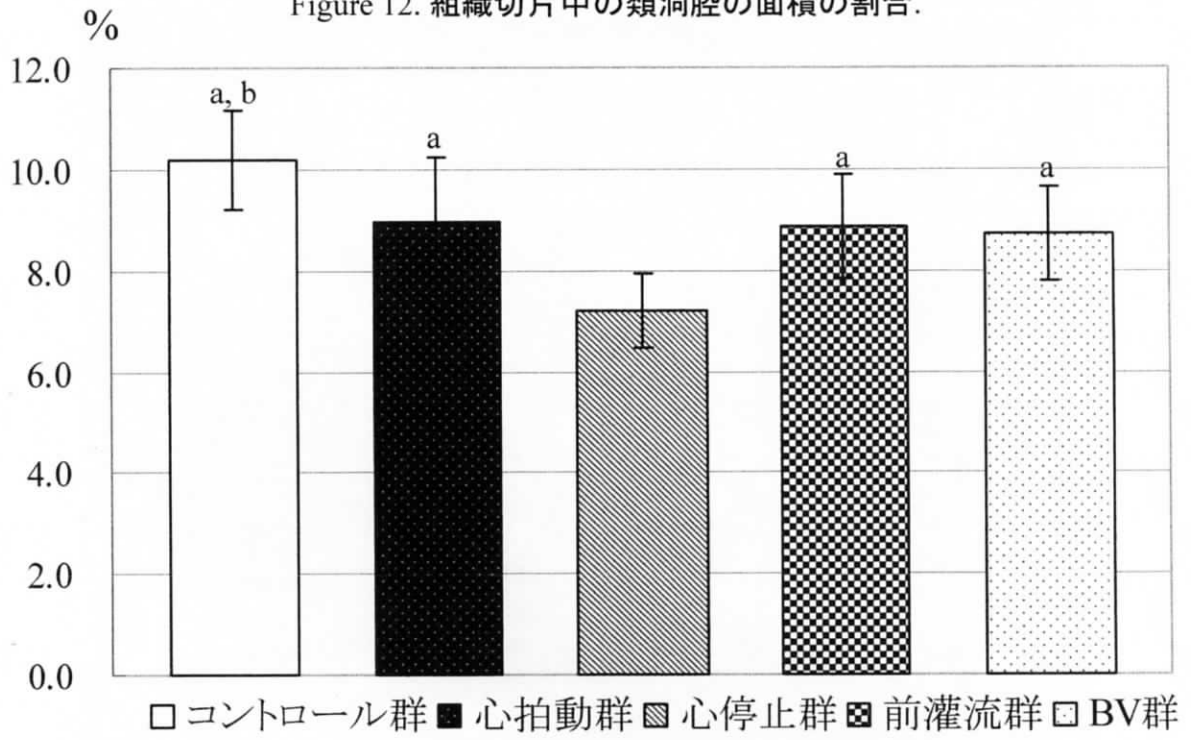


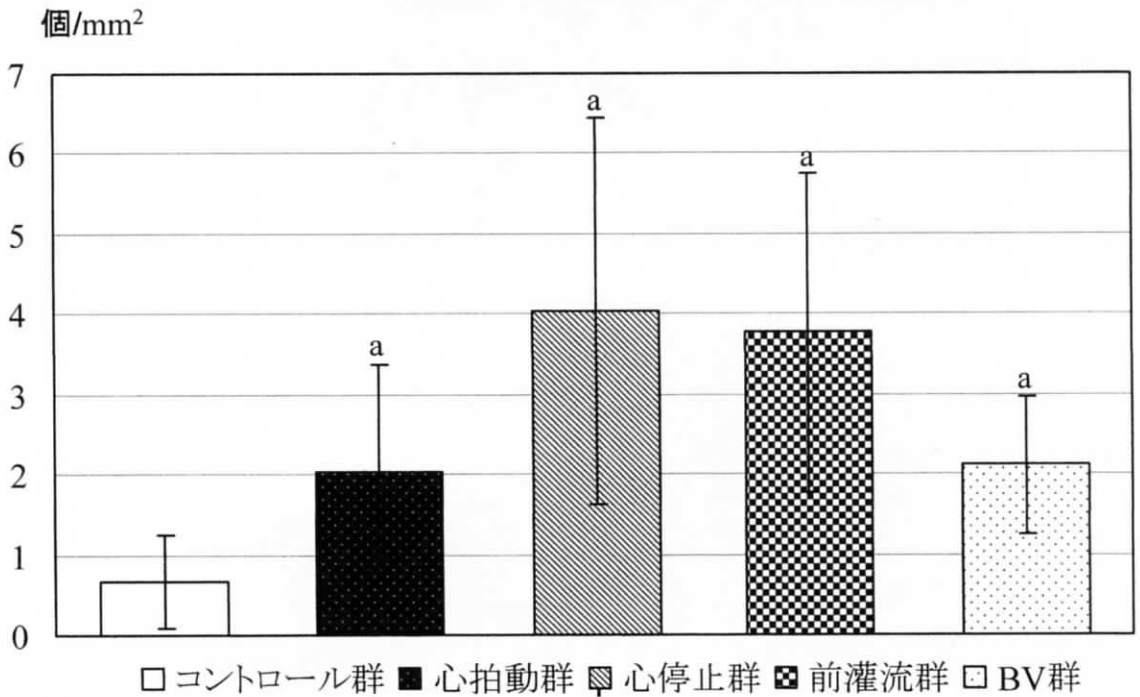
Figure 11. 再灌流後肝グラフト光学顕微鏡所見 (×100)
A: コントロール群, B: 心拍動群, C: 心停止群, D: 前灌流群, E: BV群

Figure 12. 組織切片中の類洞腔の面積の割合.



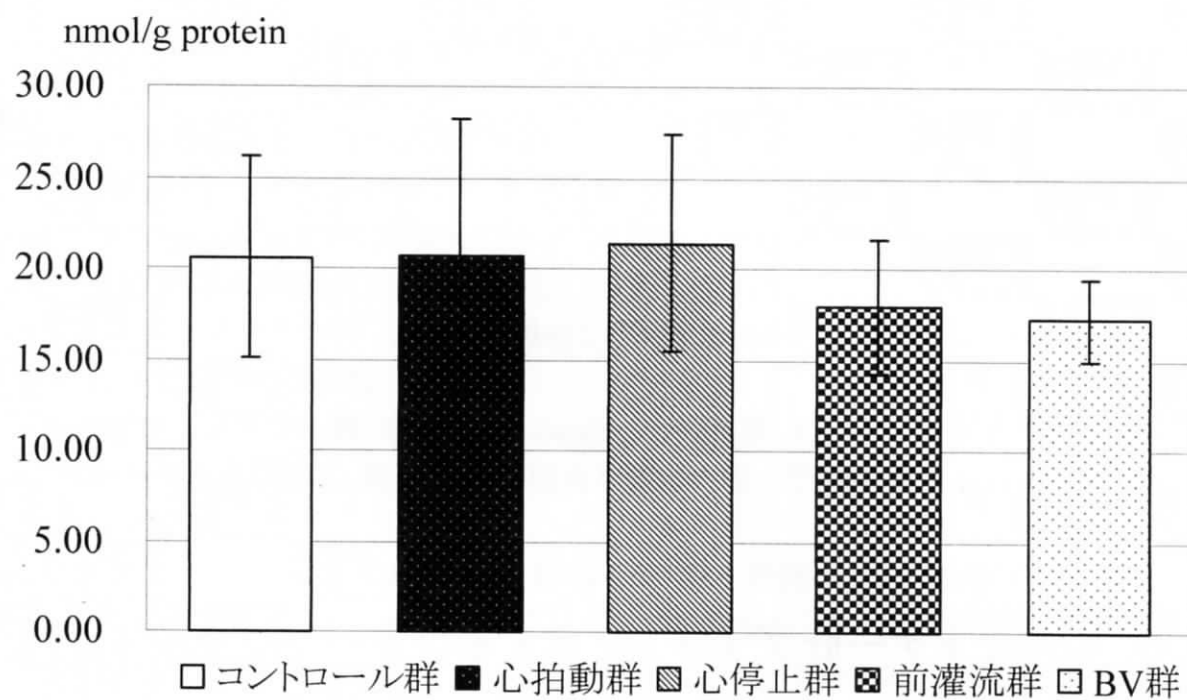
a:P<0.05 vs. 心停止群, b:P<0.05 vs. BV群

Figure 13. 組織切片1mm²当たりのTUNEL染色陽性細胞数.



a:P<0.05 vs. コントロール群

Figure 14. 再灌流後肝組織中MDA量.



B. 心停止ドナー肝グラフトに対するフリーラジカルスカベンジャー エダラボンの効果に関する実験的研究

研究方法

1. 実験動物

本動物実験は、東北大学医学系研究科動物実験委員会により承認を受け、米国の National Institutes of Health により発行された“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”に基づき施行した。

280 g-310 g の雄性 Wistar ラット（日本チャールズリバー）を以下の3群に分け、摘出肝の常温酸素化灌流を行った¹。なお、ラットは餌と水分を自由摂取させ、手術前に絶食を設けなかった。

1) 心拍動下グラフト群 (Heart-beating ; HB 群, n = 7) : 心拍動下に肝を摘出し、6時間の冷保存後再灌流。

2) 心停止下グラフト群 (Non-heart-beating ; NHB 群, n = 8) : 開胸による呼吸停止から心停止を誘導し 30 分間の温阻血を置いた後、肝臓を摘出し、6時間の冷保存後再灌流。

3) エダラボン投与群 (Edaravone ; ED 群, n = 7) : 肝摘出、6時間冷保存は NHB 群と同様に施行。再灌流液中にエダラボン (Figure 1) を 1 mg/l の濃度で添加。3群とも灌流時間は 60 分間とし、灌流液および肝組織をサンプルとして採取した。

2. 肝摘出法

ラットはペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg 体重) 腹腔内投与による全身麻酔後、正中切開により開腹。総胆管にシリコンチューブ (内径 0.5 mm、外径 1.0 mm) を挿入し、全身ヘパリン化 (heparin 1000 単位/kg 体重、静脈内投与) を行った。HB 群においては門脈に 14G テフロン静脈留置カテーテルをカットダウン法で挿入後直ちに下大静脈を切開し、10 cm H₂O の定圧で 4°C 乳酸リンゲル液 20 ml、4°C University of Wisconsin solution (UW 液) 20 ml を用いて肝内門脈血を wash out した。その後肝を摘出し、4°C UW 液中に 6 時間冷保存した。

心停止モデルである NHB 群および ED 群においては、HB 群と同様に全身ヘパリン化した後、経腹的横隔膜切開による開胸を施行することで呼吸停止を引き起こし、それに続く心停止を誘導した。開胸から心停止までの時間は、2群間に有意な差を認めなかった (622.5 秒 ± 117.8 vs. 638.8 秒 ± 102.1)。心停止後 30 分間室温に放置し、温阻血を置いた後、門脈にカテーテルを留置し、HB 群と同様に門脈血を wash out、肝を摘出した。摘出肝は同様に 4°C UW 液に単純浸漬して 6 時間の冷保存を置いた。

3. 灌流方法

ex vivo 肝灌流実験は、Gores¹らの非循環回路 (Figure 2) を用いた。回路は 0.5% クロルエキシジン液にて 30 分循環消毒し、0.2 μm フィルターを通した蒸留水で洗浄の後使用した。灌流液は、95% O₂ / 5% CO₂ 飽和クレブス-ヘンゼライト溶液

を用い、10 cmH₂O にて 60 分間常温定圧灌流した。灌流終了後サンプルとして採取した灌流液は、各々の検討項目測定まで-80°C で保存し、肝組織は、一部を組織学的検査用に 10%中性ホルマリンで固定し、他部を液体窒素にて凍結させた後、各々の検討項目測定まで-80°C で保存した。

4. 検討項目

1) 門脈灌流液量、胆汁産生量

60 分間の灌流中、15 分毎に肝静脈から流出した灌流液量を測定し、ラット肝重量当たりの門脈灌流液量を算出した。同様に 15 分毎に総胆管から流出した胆汁量を測定し、ラット肝重量当たりの胆汁産生量を算出した。

2) 生化学的検査

灌流 60 分間で流出した灌流液中の Aspartate aminotransferase (AST) 濃度、alanine aminotransferase (ALT) 濃度、および lactate dehydrogenase (LDH) 濃度を酵素比色法にて測定した。(AST, ALT : Iatron Laboratories, Inc., Tokyo) (LDH : Wako Pure Chemical Industries, Osaka)

3) 過酸化脂質

凍結保存肝組織を冷却下 HPLC グレード精製水中にホモジェナイズした。未破壊の組織を除くため 2000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し上清を採取、再度 2000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し、その上清を本検査のサンプルとした。Fe²⁺のレドックス反応を利用した lipid hydroperoxide assay kit (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) を用いて、ヒドロペルオキシド濃度を比色法で測定した。また同サンプルの蛋白量を BCA 蛋白質定量法 (Pierce, Rockford, IL) にて定量し、ヒドロペルオキシドを mg 蛋白質量当たりの濃度で算出した。

4) 炎症性サイトカイン

灌流液中の TNF- α 、IL-1 β を enzyme-linked immunosorbent assay kit (BioSource International, Inc., Camarillo, CA) にて測定した。

5) エネルギー代謝の検討

肝組織中の Adenosine triphosphate (ATP)、adenosine diphosphate (ADP)、adenosine monophosphate (AMP) 濃度を、従来の方法に若干の修正を加えて高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography : HPLC) にて測定した²。ヌクレオチド抽出のため、肝組織を 0.5 N 過塩素酸中で冷却下にホモジェナイズした。3000 rpm、4°C、10 分間の遠心分離を 2 回行い、上清を KOH にて pH 6.0~7.6 に滴定し、3000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。上清を Ultracent-30 (Tosoh Co., Ltd., Tokyo, Japan) にて濾過し、HPLC の検体とした。HPLC システムは、Jasco HPLC Analyzer System (Nihon Bunko, Tokyo, Japan) を、カラムは Wakosil-II 5c18 HG column (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を使用した。溶出液は 60mM リン酸緩衝液 (pH 5.0, 室温) を使用し、流速は 1.0 ml/分と

した。また、所定濃度の ATP、ADP、AMP (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 溶液を作成し、HPLC にて測定することにより検量線を求めた。Energy charge 値は、Atkinson の式： $\text{energy charge} = (\text{ATP} + 0.5 \text{ ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$ を用いて算出した³。

6) 誘導型 NO 合成酵素の検討

肝組織中の誘導型 NO 合成酵素 (inducible NO synthase : iNOS) 濃度を、ウェスタンブロット法にて測定した。蛋白質抽出のため肝組織をプロテアーゼインヒビターカクテル (Complete Mini, EDTA-free; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含有した Tris バッファー (10mM Tris at pH7.5, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.5% Triton X-100) で冷却下にホモジュナイズした。15,000 rpm、4°C、10 分間の遠心分離を 2 回行い、上清を回収し、サンプルバッファー (1mM Tris-HCl at pH6.8, 4% SDS, 12% β -mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue) を添加した。回収した上清の蛋白量は BCA 蛋白質定量法 (Pierce, Rockford, IL) にて定量した。

ウェスタンブロット法は以下の方法で行った。50 μ g の蛋白抽出液を 12% SDS-polyacrylamide gel にて泳動後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。転写した膜を 5% スキムミルク添加 PBS-T (0.1% Tween-20 添加 PBS) にてブロッキングし、5% スキムミルク添加 PBS-T にて 10,000 倍希釈した iNOS 一次抗体 (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA) と 4°C で一晩反応させた。二次抗体は horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA) を使用し、5% スキムミルク添加 PBS-T で希釈し、1 時間反応させた。目的とする蛋白質の検出は、ECL (the enhanced chemiluminescent, Amersham Pharmacia Biotech) 法に準じた。化学発光はルミノ・イメージアナライザー (LAS-1000, Fujifilm, Tokyo) で撮影した。蛋白発現の定量分析は、Image Gauge for Windows Version 3.45 (Fujifilm, Tokyo) で撮影の解析を行い、同サンプルから得られた Actin 発現量との相対比として算定した。Actin の一次抗体は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入し使用した。

7) 開存類洞腔の検討

微小循環障害の評価のため、組織標本にて開存類洞腔面積比率を算出した (Figure 3)。標本は、60 分間灌流後の肝組織を 10% 中性ホルマリン固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施したものをを用いた。光学顕微鏡にて 100 倍率の視野を各検体につき無作為に 10 視野ずつ画像ファイルとして取り込み、画像の色彩を Photoshop ソフトウェア (Adobe, San Jose, CA) にて白黒二元化 (黒：開存類洞腔、白：肝構成細胞や閉塞した類洞領域) した後、NIH Image ソフトウェア (U.S. National Institute of Health, Bethesda, MD) を用いて白黒各々のピクセル

数をカウントし、黒ピクセル数 / 全ピクセル数比率を算出した。グリソン鞘内の動脈、門脈、胆管、および中心静脈内腔はカウントされるピクセルから除外した。

5. 統計学的検討

データは平均値 ± 標準偏差 (SD) で表した。また、各群間の有意差については StatView ソフトウェア (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて Mann-Whitney の U 検定を施行し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

研究結果

1 門脈灌流流量、胆汁産生量

門脈灌流流量は、NHB 群では HB 群に比し有意差はないものの低下傾向を認めた。しかし、NHB 群で見られた低下は、ED 群において改善を認め、灌流開始 15 分、30 分、45 分、60 分全ての時点で NHB 群に比し有意に高値を示した (Figure 4A)。

胆汁産生量は、NHB 群で全ての時点で HB 群に比し有意な低下を認めたが、ED 群では NHB 群に比して全ての時点で有意な改善を示した (Figure 4B)。ED 群の胆汁産生量は HB 群の産生量には及ばず、その差は全ての時点で有意なものであった。

2 生化学的検査

灌流液中の AST 値は、HB 群に比して NHB 群では有意に高値を示したが、ED 群ではその上昇は改善され、NHB 群に比して有意に低値を示した (Figure 5A)。しかし、ED 群での AST 値は HB 群よりも高値で、その差は有意であった。

灌流液中の LDH 値は、HB 群に比して NHB 群で有意な上昇を示したが、ED 群ではその上昇は改善され、NHB 群に比して有意に低値を示した (Figure 5B)。しかし、ED 群での AST 値は HB 群よりも高値で、その差は有意であった。

灌流液中の ALT 値は測定限界値以下であった。

3 過酸化脂質

肝内ヒドロペルオキシド濃度は、HB 群に比して NHB 群で有意に高値を示したが、ED 群では NHB 群で認められた濃度上昇は改善され、NHB 群に比して有意に低値を示した。また、ED 群の濃度は HB 群に比しても有意に低値を示した (Figure 6)。

4 炎症性サイトカイン

灌流液中の TNF- α 濃度は、HB 群に比して NHB 群で有意に高値を示した。ED 群ではその上昇は改善され、NHB 群に比して有意に低値を示した (Figure 7A)。

灌流液中の IL-1 β 濃度は、HB 群に比して NHB 群で有意に高値を示した。ED

群ではその上昇は軽減され、NHB 群に比し有意に低値を示したが (Figure 7B)、HB 群の濃度には及ばず、HB 群と比しては有意に高値であった。

5 エネルギー代謝

Energy charge 値は、HB 群に比して NHB 群で有意に低下を認めたが、ED 群でその低下は軽減され、NHB 群に比し有意に高値を示した (Figure 8)。

6 誘導型 NO 合成酵素

肝内での iNOS 発現は、NHB 群で若干高値を示すものの、いずれの群間でも顕著な差は無く、有意差は認めなかった (Figure 9)。

7 開存類洞腔面積

光学顕微鏡所見は、HB 群では類洞腔が十分保たれている部分が多く認められ、肝細胞の変性も少なく構造が良好に保たれていたのに対し、NHB 群では構造が破壊された類洞が目立ち、肝細胞の空胞状変性が広範囲に認められた。NHB 群でのその様な変化は、斑状に不規則な分布を呈した。ED 群では、NHB 群と比し洞腔の保たれた類洞が多く認められ、肝細胞の変性も少なかった (Figure 10)。

開存類洞腔面積比率は、HB 群に比して NHB 群で低下し、ED 群ではその低下が低減される傾向にあった (Figure 11)。しかし、いずれの群間にも有意差は認めなかった。

考察

虚血再灌流障害早期において ROS は、臓器障害をもたらすエフェクターであるだけでなく、メディエーターとしても大きな役割を担っていると考えられている⁴⁻⁸。そこで、強力なラジカルスカベンジャーであるエダラボンが、温阻血冷保存を被る心停止ドナー肝グラフトの機能改善に有効であるかを検討した。その結果、エダラボンを再灌流液に加える事により、門脈灌流液量・胆汁産生量の増加、脂質過酸化の抑制、肝酵素の逸脱低減、エネルギー代謝の改善、炎症性サイトカインの産生抑制を認め、心停止ドナー肝グラフトの機能改善に有効性を示した。

本研究は、臨床的な uncontrolled NHBD からの肝移植を想定したものであり、Casavilla らの報告⁹を元に、30 分間といった温阻血時間の設定や心停止前処置の有無など、臨床的状況を反映するような肝グラフト摘出過程を計画し、さらに uncontrolled NHBD として、開胸による心停止を誘導したいわゆる死戦期を被ったモデルを使用した。本モデルは、経横隔膜切開による開胸により呼吸停止を引き起こし、引き続き心停止が誘導されるが、開胸から心停止までの約 10 分間にわたって全身への血流低下が徐々に起こることで、腸管は壁色調の蒼白化や蠕動低下といった肉眼的な虚血性変化を呈し、肝グラフトは鬱血も加わり暗紫色の色調変化を呈した。本モデルの肝グラフトは、そのような虚血状態の腸

管からエンドトキシンや TNF- α の放出等の影響を受け、また肝グラフト自体も鬱血による障害を被ると考えられる^{10,11}。Zhang らは、本心停止モデルが塩化カリウム注射による心停止モデルと比して心停止後の ATPase 活性や TNF- α 濃度、動脈血酸素分圧に有意に違いがあることを報告している¹⁰。心停止ドナー移植を想定した本実験においては、このモデルを使用するのが適切と考えられた。

本研究において心停止ドナー肝グラフトの機能改善を目的に用いたエダラボンは、ヒドロキシラジカルを消去する強力なフリーラジカルスカベンジャーであり、本邦で急性脳梗塞の治療薬として適応のある薬剤である。エダラボンの肝障害に対する有用性についてもいくつか報告されている中、Kono らのリポポリサッカライドによる肝障害に対してのエダラボンの効果¹²や、Abe らの低酸素-再酸素化を施されたラット肝細胞に対してのエダラボンの効果の報告¹³から、エダラボンは濃度依存性に肝障害軽減効果を示すと考えられる。Abe らの報告では、1.74mg/l の培養液中エダラボン濃度で酸化ストレス低減の最大効果を得られており、Ninomiya らの温阻血のみ¹⁴、あるいは冷保存のみ¹⁵を被った肝の ex vivo 再灌流実験での報告では、1mg/l の灌流液中エダラボン添加で肝虚血再灌流障害の軽減に効果があったと報告している。脳梗塞治療の投与量でのエダラボン最高血中濃度は、健常成人において 0.888mg/l であり、本研究においては、臨床への外挿を考慮し、エダラボンを灌流液中に 1mg/l の濃度で添加することでその効果を検討することが適切と考えられた。

ROS による肝構成細胞への直接的な酸化ストレスは、非酵素的な反応で生体膜のリン脂質を過酸化させ、細胞膜の機能形態を変質させる事である⁴⁻⁶。本研究において、温阻血を被った肝グラフトは、心拍動下に摘出した肝グラフトに比べて肝内ヒドロペルオキシドが増加していたが、エダラボンを加えたバッファーにより再灌流を行うことで、肝内ヒドロペルオキシドは減少した。このことから、エダラボンは心停止ドナー肝グラフトにおいて、ROS による脂質過酸化反応を抑制したと考えられた。同様な実験結果としては、冷保存を置かない温阻血肝の再灌流実験において、エダラボン投与が脂質過酸化の副産物であるマロンジアルデヒドの生成を抑制したとの報告もある¹⁴。また、逸脱酵素である AST の灌流液中の濃度がエダラボンにより減少したことから、エダラボンによる ROS 消去が細胞膜脂質過酸化を抑制し、細胞膜の障害軽減に繋がったと考えられた。

肝グラフトの細胞機能維持において、エネルギー代謝は重要な要素の一つである。エネルギー代謝を評価する指標として用いられる energy charge 値は、臓器機能と正の相関を示し、グラフト機能評価にも用いられる³。Okatani らは、肝門部部分クランプによる部分温阻血ラットモデルにおいて、エダラボン投与がエネルギー代謝の中心となるミトコンドリアの膨化といった構造破壊を抑制

し、ミトコンドリア機能の保持に効果があったと報告している¹⁶。また、Abeらの報告では、分離培養したラット肝細胞に低酸素-再酸素化を施した際に、エダラボン投与が培養液中の ATP 濃度を改善させた¹³。本研究において、energy charge は、心停止下摘出の肝グラフトでは心拍動下摘出の肝グラフトに比べて低下したが、エダラボン投与下再灌流によりその低下は抑制された。このことから、エダラボンの ROS 消去作用により、心停止ドナー肝グラフトのミトコンドリア傷害が軽減され、その結果、エネルギー代謝障害が改善したと考えられた。また、心停止ドナーグラフトに認められた胆汁産生の低下がエダラボンにより改善した。これは、エネルギー代謝の改善が、肝グラフトの包括的機能を示す胆汁産生の改善をもたらしたものと考えられた。

肝温阻血再灌流障害を被った肝グラフトでは、類洞の狭小化や閉塞が認められ、これらが肝グラフトの微小循環障害をもたらし、ひいてはグラフト機能不全に大きく関わっていると考えられている^{17,18}。類洞の狭小化や閉塞の原因としては、類洞内皮細胞の変性および細胞死による細胞脱落や、再灌流時に誘導されるエンドセリン等の血管収縮因子と NO 等の血管拡張因子の不均衡等が報告されている^{19~21}。類洞微小循環障害の指標としては、門脈灌流量が古典的ではあるが、非常に明解で一般的に用いられている。本実験における門脈灌流量の検討では、従来の報告通り心停止ドナー肝グラフトで門脈灌流量の減少が認められた。一方、エダラボンの再灌流液への添加により門脈灌流量は増加し、エダラボンの心停止ドナー肝グラフト類洞微小循環障害軽減効果が示唆された。肝内循環の評価手段として、生体顕微鏡、近赤外線分光計、造影 MRI 等が報告されている。Schauer らは、ラット肝を生体顕微鏡で観察し、実際に灌流のある類洞腔の割合や、類洞に集積接着した好中球数を算出して微小循環障害を評価している²²。本研究では、ヘマトキシリン-エオジン染色標本上で開存している類洞腔を画像処理による抽出後、対肝実質面積の割合で定量化して肝内微小循環の評価を試みた。心停止ドナー肝グラフトでは、類洞の狭小化や閉塞している領域がびまん性あるいは斑状に不規則な分布を示し、循環障害をきたしている部分は heterogonous に存在していた。その為、異なった肝葉より切片を作成し、1 切片から 10 視野を抽出した解析を行い、できる限り肝全体の類洞開存率を表現するように努めた。その結果、エダラボンの添加により平均値では開存類洞面積の比率は増加し、微小循環改善効果が示唆されたが、個々の測定値にばらつきが大きく、有意差には至らなかった。切片作成時のアーティファクトや、色彩の二元化の際に生じる誤差の影響も考えられ、今後の検討課題と思われた。さらに、血管収縮因子と血管拡張因子の不均衡が類洞狭小化の原因の一つと考えられている点に着目し、虚血再灌流時の NO 動態に関与する誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) をウェスタンブロット法にて測定し、その検討も試みた。その結果、

心拍動下摘出肝グラフト iNOS 発現量と心停止下摘出肝グラフト iNOS 発現量の間には有意な格差は認められなかった。iNOS は、肝虚血再灌流障害において再灌流開始後 4 から 6 時間で誘導されるといった報告があり²³、本実験の 1 時間再灌流では iNOS は誘導前段階であることからこのような結果となったと考えられた。

肝虚血再灌流障害において、TNF- α や IL-1 β は非常に重要なメディエーターである。つまり、TNF- α は、epithelial neutrophil-activating peptide 78 等のケモカインを誘導し、好中球の遊走、活性化をもたらす、さらにはクッパー細胞の ROS 放出をも誘導する²⁴⁻²⁶。また、IL-1 β は、クッパー細胞からのさらなる TNF- α の産生や、好中球の ROS 産生を誘導する^{27,28}。さらに、TNF- α は、肝細胞のミトコンドリア障害をもたらす、細胞死を誘導する等、それ自身が臓器障害をもたらすエフェクターであると考えられている^{29,30}。そして、これら炎症性サイトカインは、クッパー細胞除去によりその産生が抑制されること等から^{24,31}、クッパー細胞が主な産生細胞と考えられている。ROS の炎症性サイトカイン産生への関与については、ROS がクッパー細胞活性化あるいは細胞内シグナル伝達系を直接活性化させてサイトカイン産生を誘導すると報告されている^{32,33}。Suzuki らは、ラット肝部分虚血モデルにおいてエダラボンが TNF- α 、IL-1 β の mRNA 発現を抑制したと報告しており³⁴、本研究においては、エダラボンが心停止ドナー肝グラフト灌流液中の炎症性サイトカイン濃度を低下させた。ROS 消去が、温阻血再灌流に伴うクッパー細胞活性化並びに炎症性サイトカイン産生を抑制したと考えられた。

我々は、心停止ドナー肝グラフトの ex vivo 灌流実験モデルを用いて、ROS 消去作用を持つエダラボンが生体膜の脂質過酸化、炎症性サイトカイン産生を抑制し、胆汁産生に代表される肝機能、灌流量や類洞開存率に代表される微小循環を改善することを見いだした。本研究は、灌流用バッファーによる ex vivo 再灌流実験であることから、白血球や血小板といった血球成分が再灌流障害時にもたらす作用は肝グラフト機能に反映されない。また、非再循環回路による灌流であるため、肝グラフトから生成されたメディエーターがグラフト自体に及ぼす影響は軽減されている可能性が考えられる。エダラボンは、本 ex vivo 再灌流実験により心停止ドナー肝グラフト移植の実用化において有望な薬剤となる可能性が示唆されたが、より頑強な効果検証に向け、肝移植実験による今後の更なる検討が必要と考えられた。

結論

ROS は温阻血冷保存によってもたらされる虚血再灌流障害において重要な役

割を担っており、エダラボンによる ROS 抑制が心停止ドナーからの肝移植におけるグラフト機能改善に有効であると考えられた。

参考文献

1. Gores GJ, Kost LJ, LaRusso NF: The isolated perfused rat liver: conceptual and practical considerations. *Hepatology* 6:511-517, 1985
2. Ohkohchi N, Endoh T, Oikawa K, et al: Fragility of the electron transport chain and superoxide generation in mitochondria of the liver graft after cold ischemia. *Transplantation* 67:1173-1177, 1999
3. Atkinson DE: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7:4030-4034, 1968
4. Jaeschke H: Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 79:115-136, 1991
5. Ravanat JL, Di Mascio P, Martinez GR, et al: Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J Biol Chem* 276:40601-40604, 2000
6. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159-163, 1985
7. Cutrin JC, Boveris A, Zingaro B, et al: *In situ* determination by surface chemiluminescence of temporal relationships between evolving warm ischemia-reperfusion injury in rat liver and phagocyte activation and recruitment. *Hepatology* 31:622-632, 2000
8. Semenza GL: Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ. Res* 86:117-118, 2000
9. Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, et al. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplantation* 59:197-203, 1995.
10. Zhang Y, Ohkohchi N, Oikawa K, et al: Assessment of viability of the liver graft in different cardiac arrest models. *Transplant Proc* 32:2345-2347, 2000
11. Gollig M, Mehrabi A, Blum K, et al: Effects of hemodynamic instability on brain death-induced prepreservation liver damage. *Transplantation* 75:1154-1159, 2003
12. Kono H, Asakawa M, Fujii H, et al. Edaravone, a novel free radical scavenger, prevents liver injury and mortality in rats administered endotoxin. *J Pharmacol Exp Ther* 307:74-82, 2003
13. Abe T, Unno M, Takeuchi H, et al: A new free radical scavenger, edaravone, ameliorates oxidative liver damage due to ischemia-reperfusion in vitro and in vivo. *J Gastrointest Surg* 8:604-615, 2004
14. Ninomiya M, Shimada M, Harada N, et al: Beneficial effect of MCI-186 on hepatic

- warm ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 74:1470-1472, 2002
15. Ninomiya M, Shimada M, Harada N, et al: The hydroxyl radical scavenger MCI-186 protects the liver from experimental cold ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 91:184-190, 2004
 16. Okatani Y, Wakatsuki A, Enzan H, et al: Edaravone protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Eur J Pharmacol* 465:163-170, 2003
 17. Menger MD, Richter S, Yamauchi J, et al: Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 46:1452-1457, 1999
 18. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, et al: Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 145:1421-1431, 1994
 19. Dhar DK, Yamanoi A, Ohmori H: Modulation of endothelin and nitric oxide: a rational approach to improve canine hepatic microcirculation. *Hepatology* 28:782-788, 1998
 20. Gao W, Bentley RC, Madden JF, et al: Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 27:1652-1660, 1998
 21. Heut PM, Nagaoka MR, Desbiens G, et al: Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology* 39:1110-1119, 2004
 22. Schauer RJ, Bilzer M, Kalmuk S, et al: Microcirculatory failure after rat liver transplantation is related to Kupffer cell-derived oxidant stress but not involved in early graft dysfunction. *Transplantation* 72:1692-1699, 2001
 23. Hur GM, Ryu YS, Yuu HY, et al: Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun* 261:917-922, 1999
 24. Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S, et al: Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. *Hepatology* 26:113-120, 1997
 25. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, et al: The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 23:506-514, 1996
 26. Pober JS: Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: physiology and pathology. *Am J Pathol* 133:426-433, 1998
 27. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, et al: Interleukin 1 receptor blockade reduces

tumour necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 63:143-148, 1997

28. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M: Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 64:1398-403, 1997

29. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, et al. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am. J. Pathol* 146:1220-34, 1995

30. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the tumor necrosis receptor superfamily. *Oncogene* 17:3261-70, 1998

31. Oikawa K, Ohkohchi N, Sato M, et al: Kupffer cells play an important role in the cytokine production and activation of nuclear factors of liver grafts from non-heart-beating donors. *Transpl Int* 15:397-405, 2002

32. Wheeler MD, Yamashina S, Froh M: Adenoviral gene delivery can inactivate Kupffer cells: role of oxidants in NF-kappaB activation and cytokine production. *J Leukoc Biol* 69:622-630, 2001

33. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, et al: Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 165:1013-1021, 2000

34. Suzuki F, Hashikura Y, Ise H, et al: MCI-186 (edaravone), a free radical scavenger, attenuates hepatic warm ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Int* 18:844-853, 2005

Figure 1

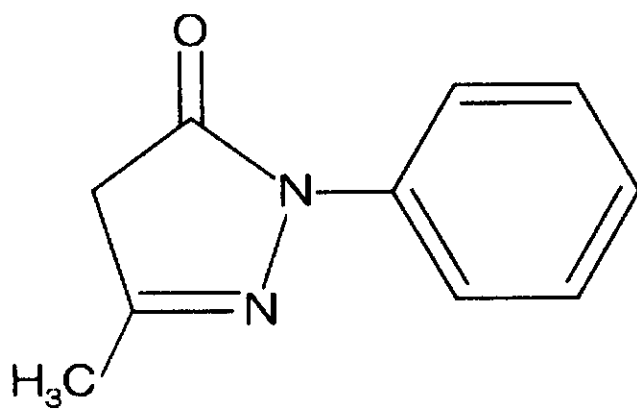


Figure 1

エダラボン科学構造式
MCI-186 (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)

Figure 2

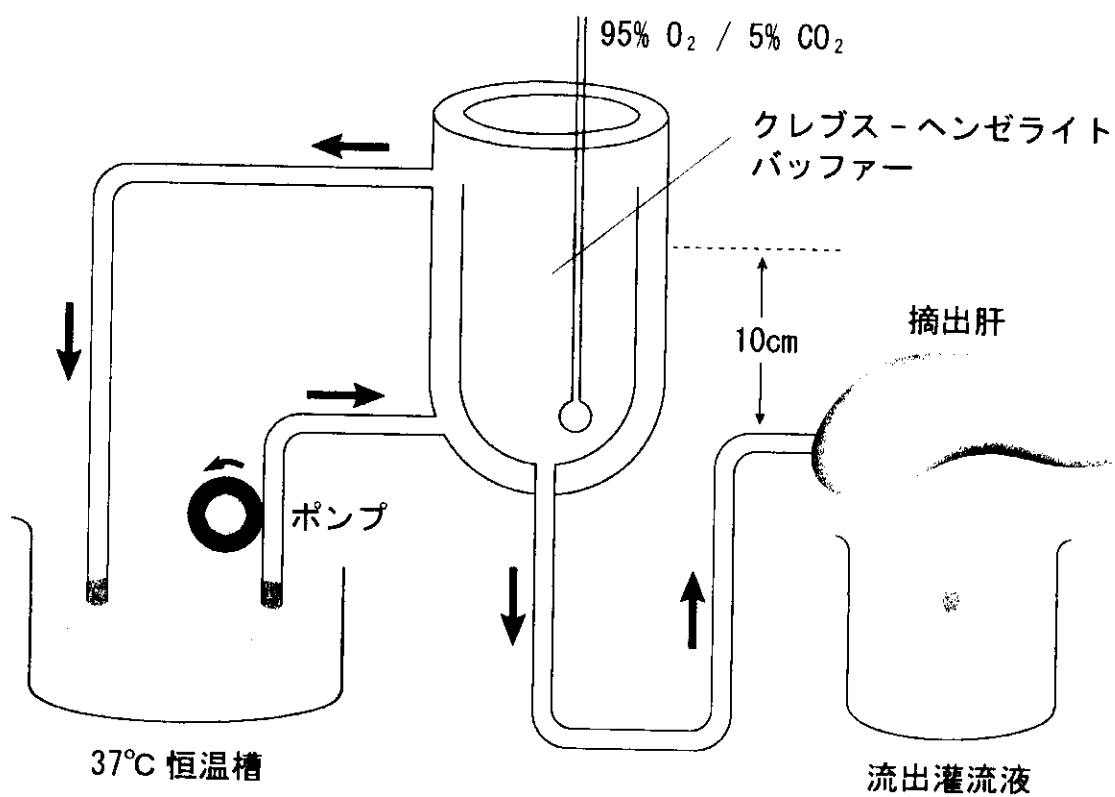
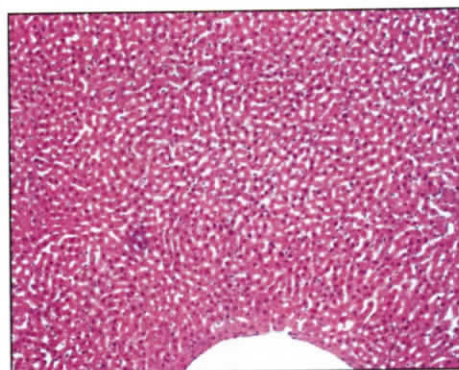


Figure 2

再灌流回路図

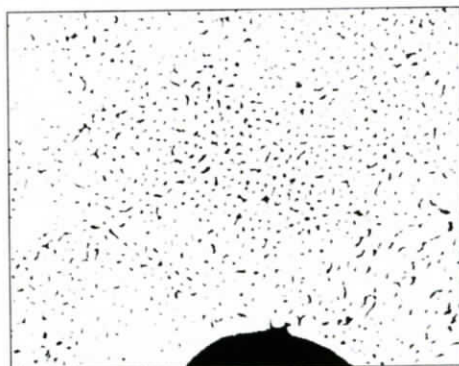
Figure 3

10視野 / 検体
100倍視野HE標本



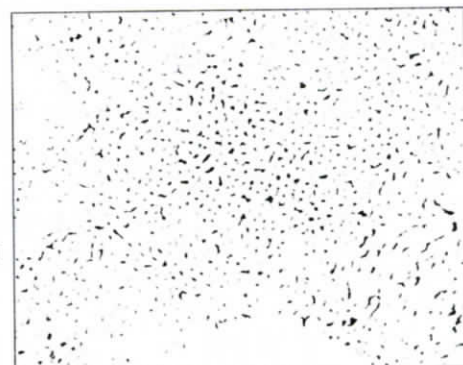
《色彩二分化》

100倍率視野を
Photoshopソフト
ウェアにて色彩
二分化



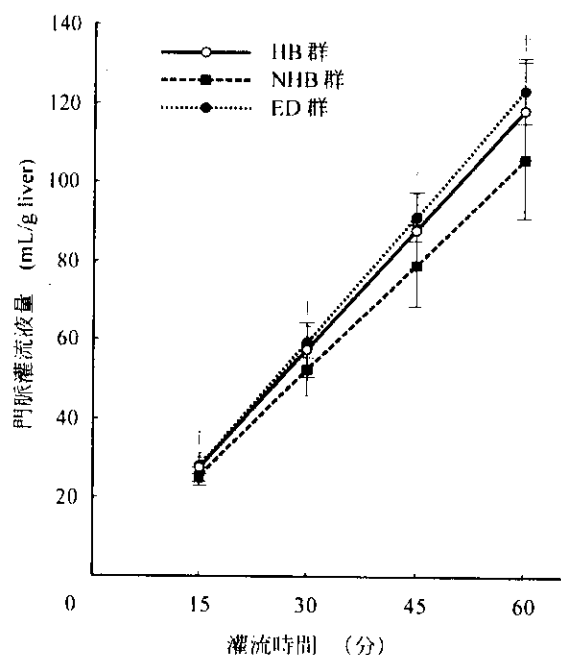
《脈管の除去》

グリソン鞘内の
脈管および中心
静脈内腔を除去



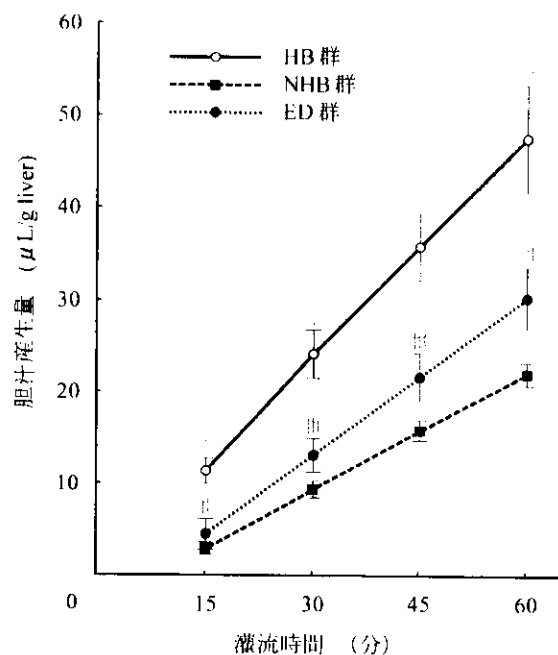
開存類洞腔面積比率 = 開存類洞腔面積 (赤pixels) / 肝実質面積 (青pixels)

Figure 4A



* P < 0.05 vs. NHB 群

Figure 4B



* P < 0.01 vs. NHB 群
 ** P < 0.005 vs. NHB 群
 † P < 0.005 vs. ED 群

Figure 4

10 cm H₂O 常温定圧灌流中の門脈灌流液量、および胆汁産生量の推移。NHB 群に比し、ED 群にて灌流開始15分、30分、45分、60分全ての時点において門脈灌流液量は有意に高値を示した (A)。胆汁産生量も、NHB 群に比し、ED 群にて全ての時点で有意に高値を示した (B)。

Figure 5A

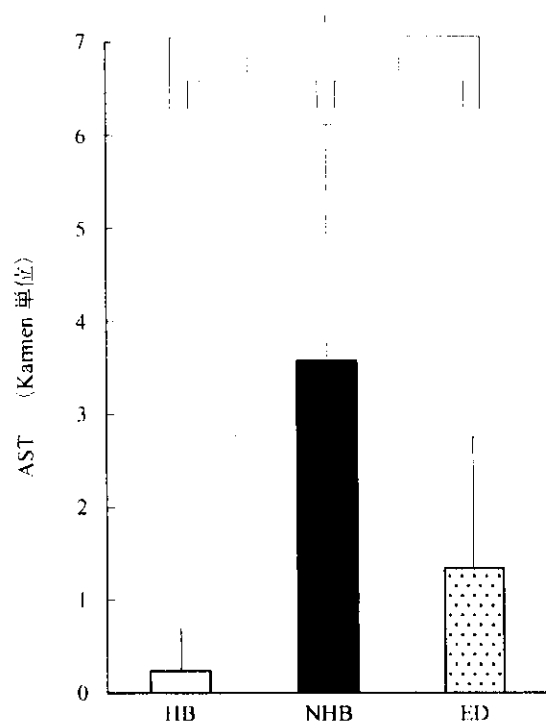
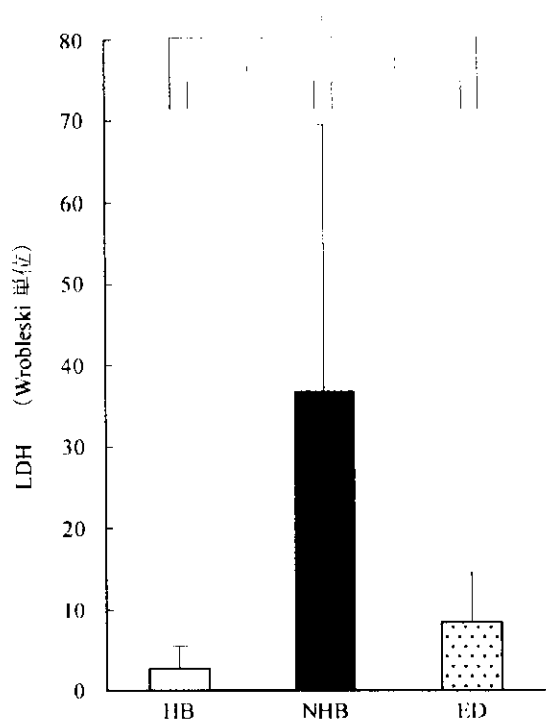


Figure 5B



$P < 0.05$

Figure 5

60分間常温定圧灌流で流出した灌流液中のAST濃度、およびLDH濃度。AST濃度、LDH濃度ともに、NHB群に比しED群にて有意に低値を示した (A) (B)。

Figure 6

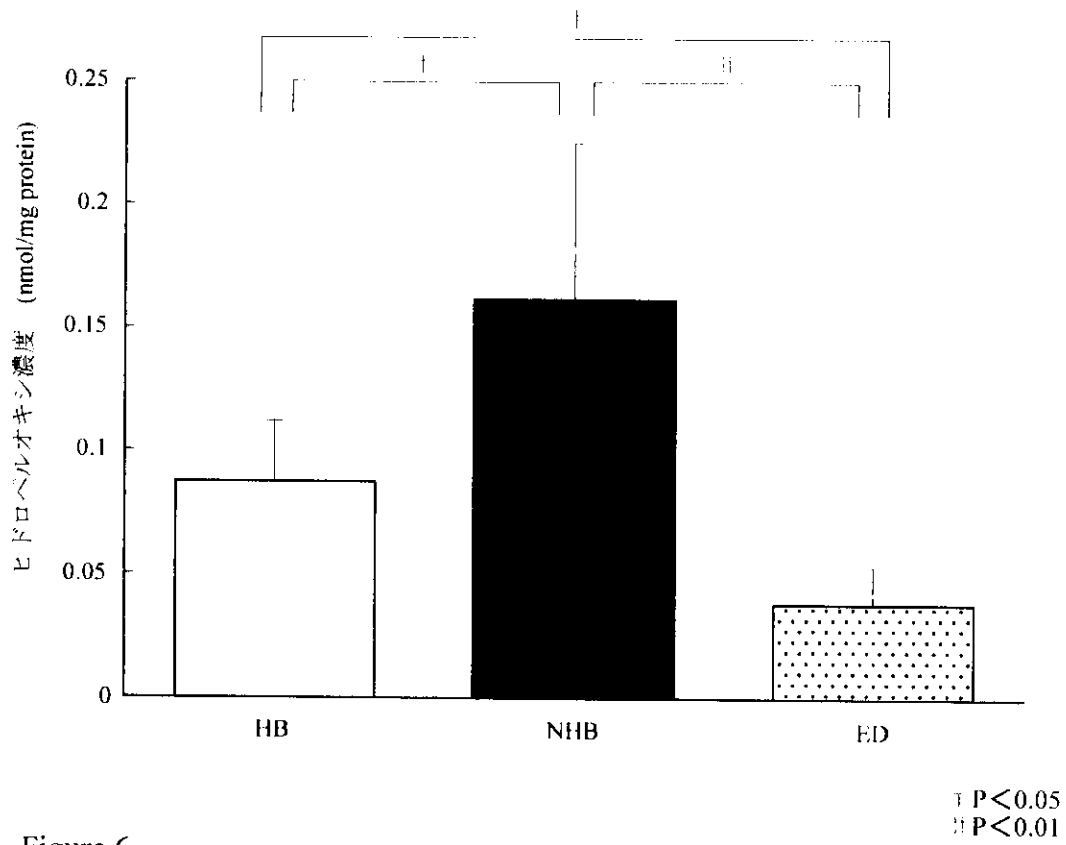


Figure 6

再灌流後の肝組織中のヒドロペルオキシ濃度。ED群は、HB群およびNHB群に比し、有意に低値を示した。

Figure 7A

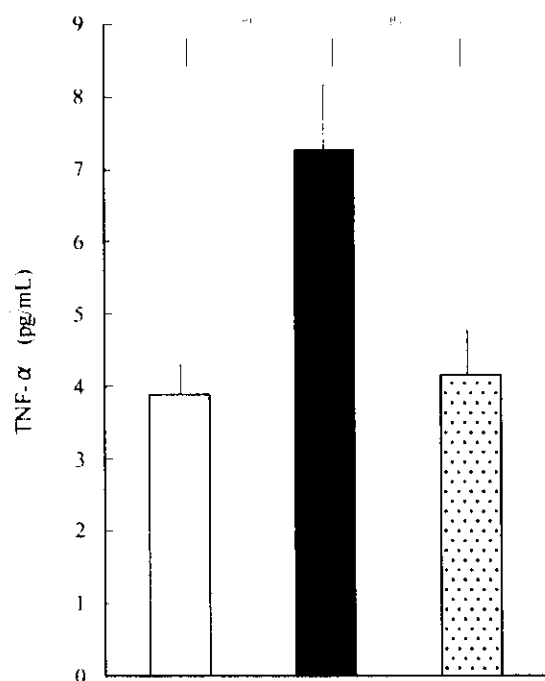
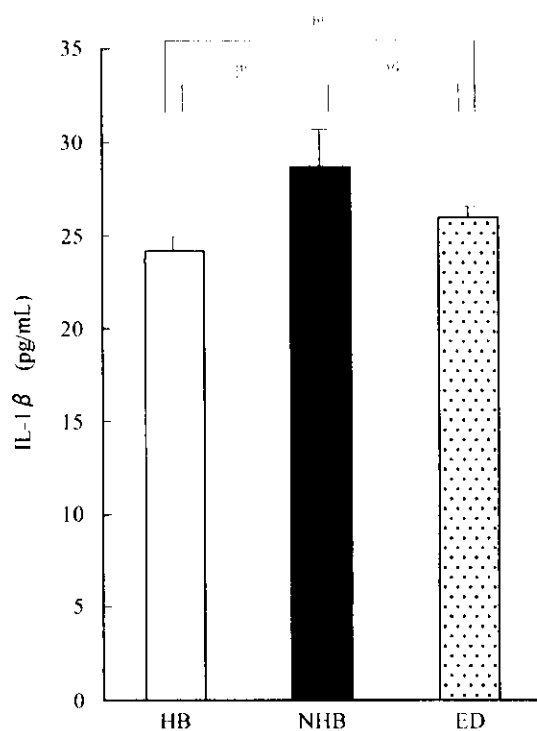


Figure 7B



* $P < 0.005$

Figure 7

60分間常温定圧灌流で流出した灌流液中のTNF- α 濃度、およびIL-1 β 濃度。TNF- α 濃度、IL-1 β 濃度ともに、NHB群に比しED群にて有意に低値を示した (A) (B)。

Figure 8

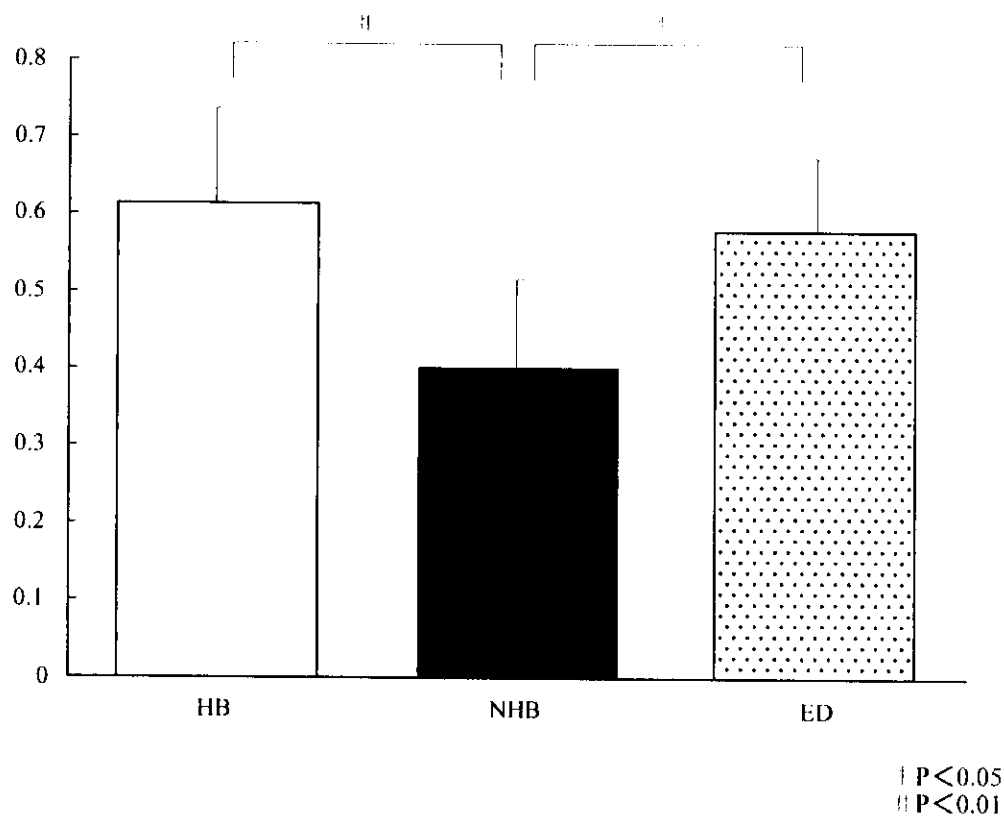


Figure 8

再灌流後の肝組織におけるエネルギーチャージ値。エネルギーチャージ値は、Atkinsonの式； $\text{energy charge} = (\text{ATP} + 0.5 \text{ ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$ にて算出した。NHB群に比し、ED群で有意に高値なエネルギーチャージ値を示した。

Figure 9

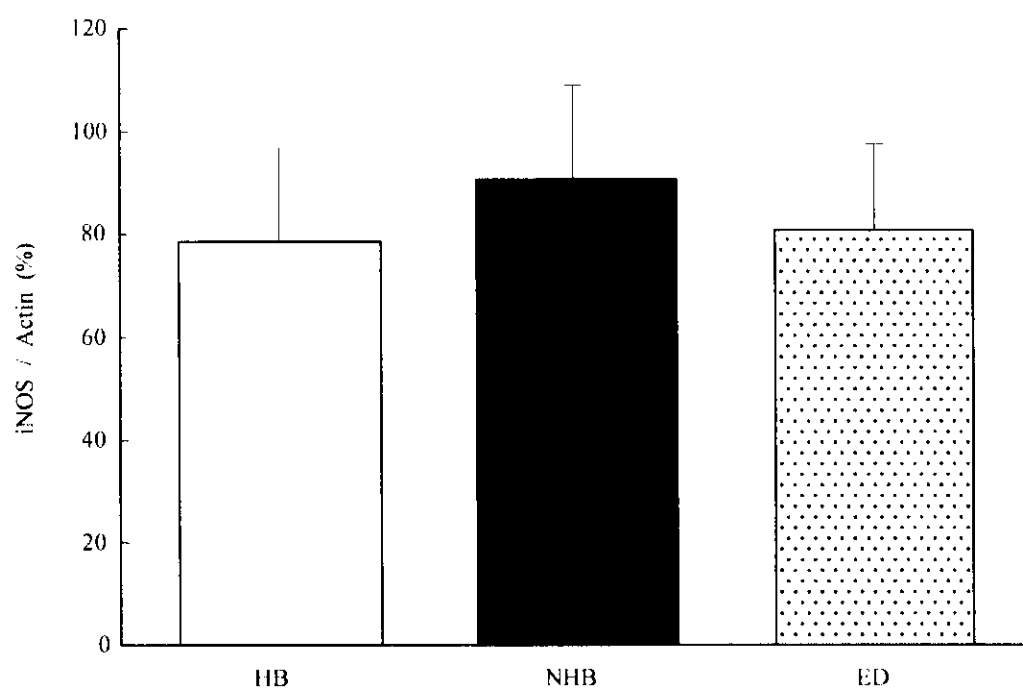


Figure 9

再灌流後の肝組織におけるiNOS発現の定量分析。値はActin発現量との相対比として算出した。NHB群で若干高値を示すものの、各々群間で有意差は認めなかった。

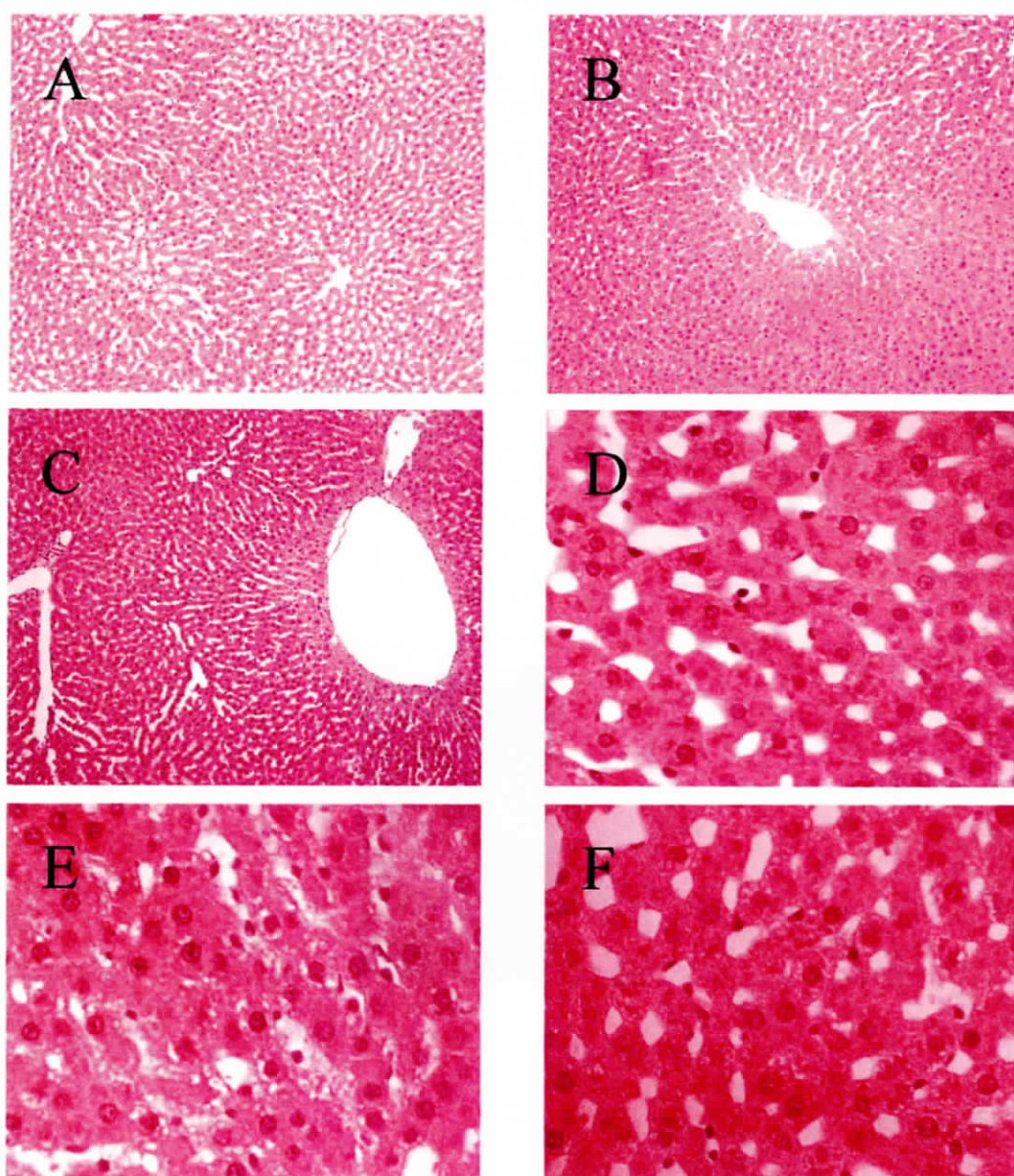


Figure 10

再灌流後の肝光学顕微鏡所見。100倍率視野（A、B、C）および400倍視野（D、E、F）。HB群（A、D）では、類洞腔が十分保たれており、肝細胞の変性も少なく構造が良好に保たれていた。NHB群（B、E）では構造が破壊された類洞が目立ち、肝細胞の変性も顕著であるのに対し、ED群（C、F）では、洞腔の保たれた類洞が多く、肝細胞の変性も少なかった。

Figure 11

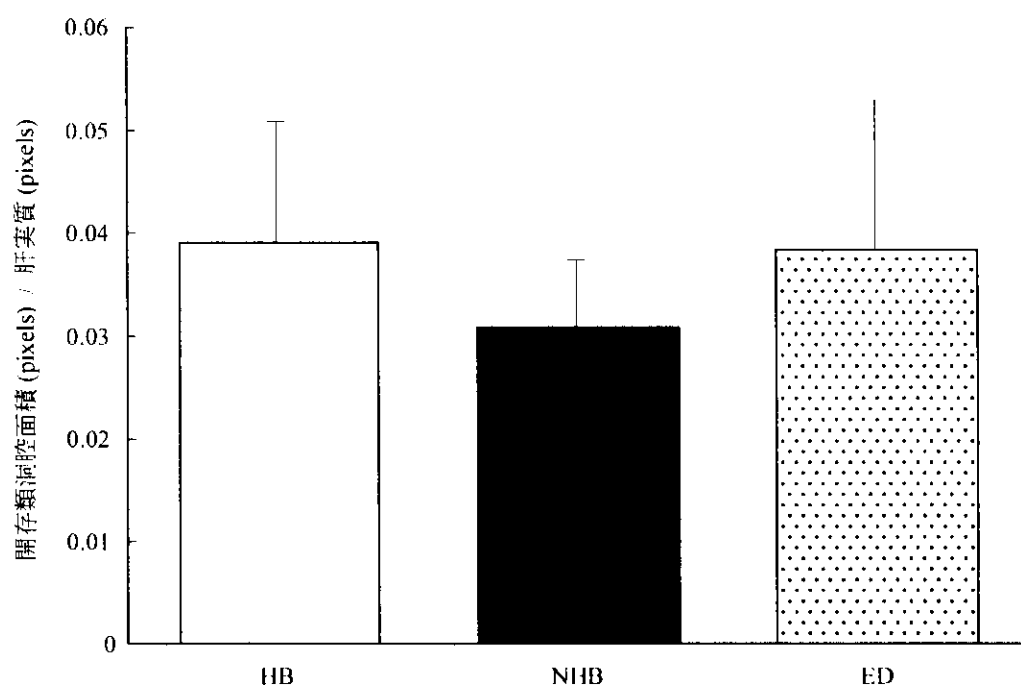


Figure 11

再灌流後の肝組織における開存類洞腔面積比率。HB群・ED群では、NHB群に比して有意差は認めないが高値を示す傾向にあった。